

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale ED 394 : Physiologie et physiopathologie

Equipe 2 U872, Systèmes Peptidiques Vasoactifs

Rôle du système kallicréine-kinines dans le diabète et ses complications

Par Louis Potier

Thèse de Doctorat de Sciences

Dirigée par Nadine Bouby

Présentée et soutenue publiquement le 14 février 2014

Devant un jury composé de :

Pr Jean-Sébastien Hulot, PUPH, Président du jury

Dr Nadine Bouby, DR, Directrice de thèse

Pr Jean-Jacques Mercadier, PUPH, Rapporteur

Dr Jean-Pierre Girolami, DR, Rapporteur

Pr Samy Hadjadj, PUPH, Examineur

A Salma et Zora
A mes parents, frères, sœur et amis

REMERCIEMENTS

Je remercie le Dr Nadine Bouby pour avoir encadrée cette thèse, pour la confiance qu'elle m'a accordée et pour avoir accompagné mes premiers pas dans le monde de la recherche.

Je remercie le Dr François Alhenc-Gelas pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour m'avoir fait découvrir le monde des kinines et pour m'avoir transmis un peu de son intelligence scientifique.

Je remercie le Dr Christine Richer pour son aide et son expertise dans le domaine de la pharmacologie et de l'ischémie reperfusion cardiaque.

Je remercie l'ensemble des membres du jury de me faire l'honneur de juger mon travail : le Pr Jean-Jacques Mercadier pour sa disponibilité, ses précieux conseils et de futures collaborations, je l'espère. Le Dr Jean-Pierre Girolami pour sa gentillesse et pour avoir bien voulu pencher son œil d'expert du système kallicréine sur mon travail. Le Pr Jean-Sébastien Hulot d'avoir accepté de faire partie du jury en tant que cardiologue et pharmacologue. Le Pr Samy Hadjadj pour avoir accepté de faire partie du jury, pour apporter son expertise de diabétologue à mon travail, et pour renforcer les liens déjà étroits entre Bichat et Poitiers.

Je remercie le Pr Ronan Roussel pour son soutien et son accompagnement depuis le début de mon internat. Travailler à ses côtés est une source d'enrichissement tant du point de vue scientifique, clinique qu'humain.

Je remercie le Pr Michel Marre de m'avoir accompagné et orienté dans mes projets de recherche et de carrière universitaire et de m'avoir pris comme chef de clinique dans son service, pour m'avoir permis de concilier activité clinique et de recherche. C'est un plaisir et un honneur de travailler à ses côtés.

Je remercie Ludovic Waeckel pour son expertise technique en biologie, sa joie de vivre (quand il ne râle pas) et la fenêtre et la musique fermées. Marie-Pascale Vincent pour sa bonne humeur et pour m'avoir transmis un petit bout de son grand savoir des techniques chirurgicales chez le rongeur. Dorinne Desposito pour avoir apporté du soleil dans le bureau. Catherine Chollet, Christopher Taveau et Florence Bordu pour leur aide technique et administrative. Sophie Bodin, rapidement croisé en M2, qui a débuté les expériences sur le métabolisme glucidique.

Je remercie mes joyeux camarades de l'équipe 1, Antoine, Basile, Guillaume, et Fouad ainsi que tous les étudiant(e)s qui sont passé dans le laboratoire.

Je remercie enfin la Société Francophone de Diabétologie et l'INSERM pour avoir soutenu financièrement ce travail.

LISTE DES PUBLICATIONS ASSOCIEES

Potier L, Waeckel L, Fumeron F, Bodin S, Fysekidis M, Chollet C, Bellili N, Bonnet F, Gusto G, Velho G, Marre M, Alhenc-Gelas F, Roussel R, Bouby N and the DESIR study group. Tissue kallikrein deficiency, insulin resistance and diabetes in mouse and man, Journal of Endocrinology, en cours de revision, 2013

Potier L, Waeckel L, Vincent MP, Chollet C, Gobeil F Jr, Marre M, Bruneval P, Richer C, Roussel R, Alhenc-Gelas F, Bouby N. Selective kinin receptor agonists as cardioprotective agents in myocardial ischemia and diabetes. J PharmacolExpTher. 2013;346(1):23-30

Waeckel L, **Potier L**, Richer C, Roussel R, Bouby N, Alhenc-Gelas F. Pathophysiology of genetic deficiency in tissue kallikrein activity in mouse and man. ThrombHaemost. 2013;110(3):476-83

Potier L, Waeckel L, Richer C, Roussel R, Bouby N, Alhenc-Gelas F. Tissue kallikrein, blood pressure regulation, and hypertension: insight from genetic kallikrein deficiency. Biol Chem. 2013 Mar 1;394(3):329-33.

Waeckel L, **Potier L**, Chollet C, Picard N, Bruneval P, Roussel R, Alhenc-Gelas F, Bouby N. Antihypertensive role of tissue kallikrein in hyperaldosteronism in the mouse. Endocrinology. 2012;153(8):3886-96

Alhenc-Gelas G, Bouby N, Richer C, **Potier L**, Roussel R, Marre M. Kinins as therapeutic agents in cardiovascular and renal diseases. Curr Pharm Des. 2011; 17(25):2654-62.

Brevet européen via INSERM transfert (EP 12305349.8) en cours pour l'utilisation des agonistes dans l'ischémie reperfusion cardiaque

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	2
LISTE DES PUBLICATIONS ASSOCIEES	3
SOMMAIRE	4
PREAMBULE	7
ABREVIATIONS.....	9
CHAPITRE I : LE SYSTEME KALLICREINE-KININES.....	10
1. INTRODUCTION.....	10
2. COMPOSANTS DU SYSTEME KALLICREINE KININES.....	11
2.1. Kininogènes	11
2.2. Kalllicréines	11
2.3. Kinines	14
2.4. Kininases.....	15
2.5. Récepteurs des kinines.....	17
2.5.1. Le récepteur B2 des kinines.....	17
2.5.2. Le récepteur B1 des kinines.....	21
CHAPITRE II : LE DIABETE	23
1. EPIDEMIOLOGIE.....	23
2. PHYSIOPATHOLOGIE	24
2.1. Diabète de type 1	24
2.2. Diabète de type 2	25
3. COMPLICATIONS	27
3.1. Physiopathologie.....	28
3.2. Complications microvasculaires	29
3.2.1. Rétinopathie diabétique	29
3.2.2. Néphropathie diabétique.....	30

3.3. Complications macrovasculaires	32
CHAPITRE III : SYSTEME KALLICREINE KININES ET DIABETE	34
1. SYSTEME KALLICREINE-KININES ET RETINOPATHIE DIABETIQUE.....	35
2. SYSTEME KALLICREINE-KININES ET NEPHROPATHIE DIABETIQUE.....	36
2.1. Effet néphroprotecteur des inhibiteurs de l'ECA.....	36
2.2. Rôle du polymorphisme de l'ECA dans la néphropathie diabétique.....	37
2.3. Rôle du SKK dans la néphropathie diabétique	39
2.4. Antagonistes des récepteurs de type 1 de l'angiotensine II et SKK	41
3. SYSTEME KALLICREINE-KININES ET NEUROPATHIE DIABETIQUE.....	42
CHAPITRE IV : OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	44
1. Introduction	44
2. Objectifs	45
CHAPITRE V : ROLE DU SYSTEME KALLICREINE-KININE DANS LE	
METABOLISME GLUCIDIQUE.....	46
1. INTRODUCTION.....	46
2. ARTICLE: TISSUE KALLIKREIN DEFICIENCY, INSULIN RESISTANCE AND DIABETES IN MOUSE AND MAN	52
3. DISCUSSION ET CONCLUSION.....	89
3.1. Etudes expérimentales	89
3.2. Etude de population humaine.....	93
3.3. Conclusion	95
CHAPITRE VI : EFFETS DE NOUVEAUX AGONISTES DES KININES DANS LES	
LESIONS D'ISCHEMIE REPERFUSION CARDIAQUE CHEZ LA SOURIS NON	
DIABETIQUE ET DIABETIQUE.	96
1. INTRODUCTION.....	96
2. ISCHEMIE-REPERFUSION CARDIAQUE	98
2.1. Mécanismes.....	101
2.1.1. Rôle du calcium	101

2.1.2.	Rôle du pH.....	101
2.1.3.	Inflammation	102
2.1.4.	Pore de transition de perméabilité mitochondriale (mitoPTP)	102
2.2.	Conséquences.....	103
2.2.1.	Sidération myocardique.....	103
2.2.2.	Phénomène de no-reflow	103
2.2.3.	Arythmies de reperfusion	103
2.2.4.	Lésions létales de reperfusion.....	103
3.	POSTCONDITIONNEMENT CARDIAQUE.....	104
3.1.	Post-conditionnement cardiaque et diabète	108
3.2.	Système kallikréine-kinines et postconditionnement.....	110
4.	AGONISTES DES RECEPTEURS DES KININES	111
4.1.	Effet des agonistes sur la pression artérielle	115
4.1.1.	Matériels et méthodes.....	115
4.1.2.	Résultats.....	116
5.	ARTICLE: SELECTIVE KININ RECEPTOR AGONISTS AS CARDIOPROTECTIVE AGENTS IN MYOCARDIAL ISCHEMIA AND DIABETES	121
6.	DISCUSSION ET CONCLUSION.....	122
CHAPITRE VII : DISCUSSION GENERALE.....		125
CHAPITRE VIII : CONCLUSION GENERALE		132
REFERENCES.....		134
ANNEXES.....		159
1.	Evolution des caractéristiques des patients de la cohorte DESIR selon leur génotype RR, RH et HH sur les 9 ans de suivi.	159
2.	protocole d'ischémie-reperfusion cardiaque	161
LISTE DES FIGURES.....		165
RESUME.....		167

PREAMBULE

Cette thèse est le fruit de 3 années et demie de travail au sein de l'équipe 2 U872 du Centre de Recherche des Cordeliers. Il fait suite à un travail débuté en Master 2 en 2008-2009. Cette thèse a nécessité un travail à temps plein les 2 premières années. L'année et demie suivante a été partagée entre le travail de recherche et d'écriture et une activité clinique au sein du service de Diabétologie du Pr Michel Marre au CHU Bichat-Claude Bernard. L'activité de recherche à temps plein m'a ainsi permis de réaliser moi-même la majorité des expériences présentées dans cette thèse, avec l'aide bien sûr de mes partenaires de travail.

Mon travail porte sur le système kallicréine kinine et le diabète. Le système kallicréine kinine est un système peptidique vasomoteur étudié depuis plusieurs années au sein du laboratoire qui a même développé une modèle génétique d'étude de ce système. De par ma formation médicale et ma spécialisation en endocrinologie et plus spécialement en diabétologie, mon travail a donc été d'étudier le rôle de ce système dans le diabète et ses complications.

La première partie de mon travail, qui fait suite à mon travail de M2, a porté sur le rôle du système kallicréine kinine dans le développement des anomalies métaboliques du diabète de type 2. Ce travail, bien que basé sur l'étude de plusieurs modèles, à la fois murins et humains, n'a pas permis de confirmer nos hypothèses de départ. La deuxième partie s'intègre dans une approche thérapeutique nouvelle par utilisation d'agonistes spécifiques des récepteurs des kinines, récemment développés par une équipe universitaire québécoise. Les effets de ces agonistes ont été étudié dans un modèle d'ischémie-reperfusion cardiaque.

Le travail présenté ici a été soutenu et permis financièrement par une allocation recherche de la SFD en 2011, et l'obtention d'un poste d'accueil INSERM en 2011.

Il a permis la rédaction de deux articles dans des journaux internationaux à comité de lecture, une communication orale au congrès de la Société Francophone du Diabète (SFD), et un poster au congrès de l'American Diabetes Association (ADA). Cette thèse est construite autour de ces deux articles, le premier est en resoumission après révision dans Journal of Endocrinology et le deuxième est publié dans Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. Elle débute par une introduction générale sur le système kallicréine kinine, le diabète et leurs relations. Chaque article est précédé d'une introduction et suivi par une conclusion spécifique où les résultats sont discutés plus en détail que ce que ne permet une discussion d'article. Enfin une discussion et une conclusion générale ferment ce travail.

En espérant que vous prendrez plaisir à lire ce travail, bonne lecture !

ABREVIATIONS

AP M/N	Carboxypeptidase M ou N
APP	Aminopeptidase P
B1R	Récepteur B1
B2R	Récepteur B2
BK	Bradykinine
DT1	Diabète de type 1
DT2	Diabète de type 2
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
EPN	Endopeptidase neutre
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FC	Fréquence cardiaque
GSK-3β	Glycogen synthase kinase 3 β
GTT	Test de tolérance au glucose
IEC	Inhibiteur de l'enzyme de conversion
IR	Ischémie-reperfusion
ITT	Test de tolérance à l'insuline
KBPM	Kininogène de bas poids moléculaire
KD	Kallidine
KHPM	Kininogène de haut poids moléculaire
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MitoPTP	Pore de transition de perméabilité mitochondrial
PAM	Pression artérielle moyenne
PC	Préconditionnement
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PK	Kallicréine plasmatique
TK	Kallicréine tissulaire

CHAPITRE I : LE SYSTEME KALLICREINE-KININES

1. INTRODUCTION

Le système kallikréine-kinines (SKK) est un système peptidique vasoactif ayant une puissante action vasodilatatrice. Il est composé d'enzymes activatrices, appelées kallikréines, de leurs substrats, les kininogènes et de peptides vasoactifs, appelés kinines agissant sur deux types de récepteurs : B1 et B2 (Figure 1). Ce système participe de façon importante à la régulation et au maintien du tonus vasculaire en agissant sur l'endothélium vasculaire. Son action est régulée entre autres par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) également appelé kininase II. Ce dernier permet le couplage du SKK à un autre système peptidique vasomoteur qui a une action vasoconstrictrice, le système rénine-angiotensine (SRA). L'ECA active le SRA et inhibe le SKK, permettant ainsi la régulation du tonus vasculaire. Le SKK est également impliqué dans de nombreux autres processus physiologiques ou physiopathologiques. Son rôle dans les pathologies à composantes vasculaires est bien montré notamment la néphropathie diabétique. Mais il existe aussi de nombreuses données en faveur d'une implication du SKK dans le développement et la progression de diverses pathologies ne faisant pas intervenir directement l'action des kinines sur l'endothélium. Parmi ces pathologies, il semble que le SKK soit impliqué dans les complications du diabète mais également dans le développement des anomalies métaboliques conduisant au diabète. Il existe également de nombreuses données en faveur d'un rôle du SKK dans l'ischémie-reperfusion cardiaque. L'objectif du travail présenté dans cette thèse est d'étudier le rôle du SKK dans le métabolisme glucidique et dans les lésions d'ischémie reperfusion cardiaque à l'aide d'approches expérimentales génétique et pharmacologique.

2. COMPOSANTS DU SYSTEME KALLICREINE KININES

2.1. Kininogènes

Les kininogènes sont des glycoprotéines issues de l'épissage alternatif d'un seul gène de 11 exons localisé sur le 3^{ème} chromosome chez l'homme. Il en existe deux types : le kininogène de bas poids moléculaire (KBPM, 66 kDa) et 1 kininogène de haut poids moléculaire (KHPM, 110 kDa). Ils sont synthétisés principalement au niveau du foie mais ont été également mis en évidence dans d'autres organes (rein, cœur, endothélium) et sont présents en quantité importante dans le plasma. Les deux types de kininogènes ont en commun leur chaîne lourde, constitué des domaines 1 à 4, qui leur confère des propriétés antiprotéasiques non spécifiques. Le domaine 4 constitue la partie kininoformatrice. Les kininogènes diffèrent par leur chaîne légère, de bas ou de haut poids moléculaire. La chaîne légère de haut poids moléculaire confère ainsi à ce kininogène une propriété de cofacteur de la coagulation (activité procoagulante) alors que celle de bas poids moléculaire n'a pas de fonction connue.

2.2. Kallicréines

Les kallicréines sont des sérine-protéases parmi lesquelles on distingue la kallicréine plasmatique (PK) et la kallicréine tissulaire (TK). La TK fait partie d'une grande famille appelée « kallicréines tissulaires », composée de 14 kallicréines et dont les fonctions sont très variées mais toutes différentes de la TK dont nous parlerons.

La kallicréine plasmatique est codée par un seul gène de 15 exons et synthétisée au niveau du foie sous forme d'un précurseur inactif, la prékallicréine. Elle circule dans les vaisseaux sanguins sous cette forme, complexée au KHPM. La prékallicréine peut directement être activée en PK par le facteur de coagulation XIIa. Elle peut aussi être activée par le KHPM. La

prékallicréine ainsi activée en PK, libère la bradykinine (BK), nonapeptide vasoactif, à partir du KHPM.

Alors qu'un seul gène code pour la kallicréine plasmatique, le gène de la kallicréine tissulaire (TK) appartient à une famille de gènes codant pour des protéines de structure plus ou moins proche, globalement appelées « kallicréines tissulaires ». La kallicréine tissulaire (produit du gène KLK1 chez l'homme et Klk1 chez la souris) semble être la seule enzyme de cette famille qui permet de générer des kinines *in vivo* à partir de kininogènes. Elle est exprimée dans plusieurs tissus : les glandes exocrines, salivaires, le pancréas, les reins, le cœur, les vaisseaux sanguins (cellules endothéliales et cellules musculaires lisses), le cerveau et les muscles squelettiques. La TK, initialement synthétisée sous forme d'une proenzyme, la prokallicréine, est activée par coupure protéolytique. Chez l'homme et la majorité des mammifères, la TK libère un peptide de 10 acides aminés, la lysyl-bradykinine, appelée aussi kallidine (Lys-BK ; KD) à partir du KBPM et du KHPM. Il est à noter que chez le rat et la souris, la partie amino-terminale du kininogène ne contient pas la séquence Met-Lys-Arg présente chez l'homme : ainsi, la kallicréine tissulaire murine libère exclusivement de la bradykinine et non de la kallidine, à partir des kininogènes. La kallicréine tissulaire est, *in vivo*, la principale enzyme de formation des kinines.

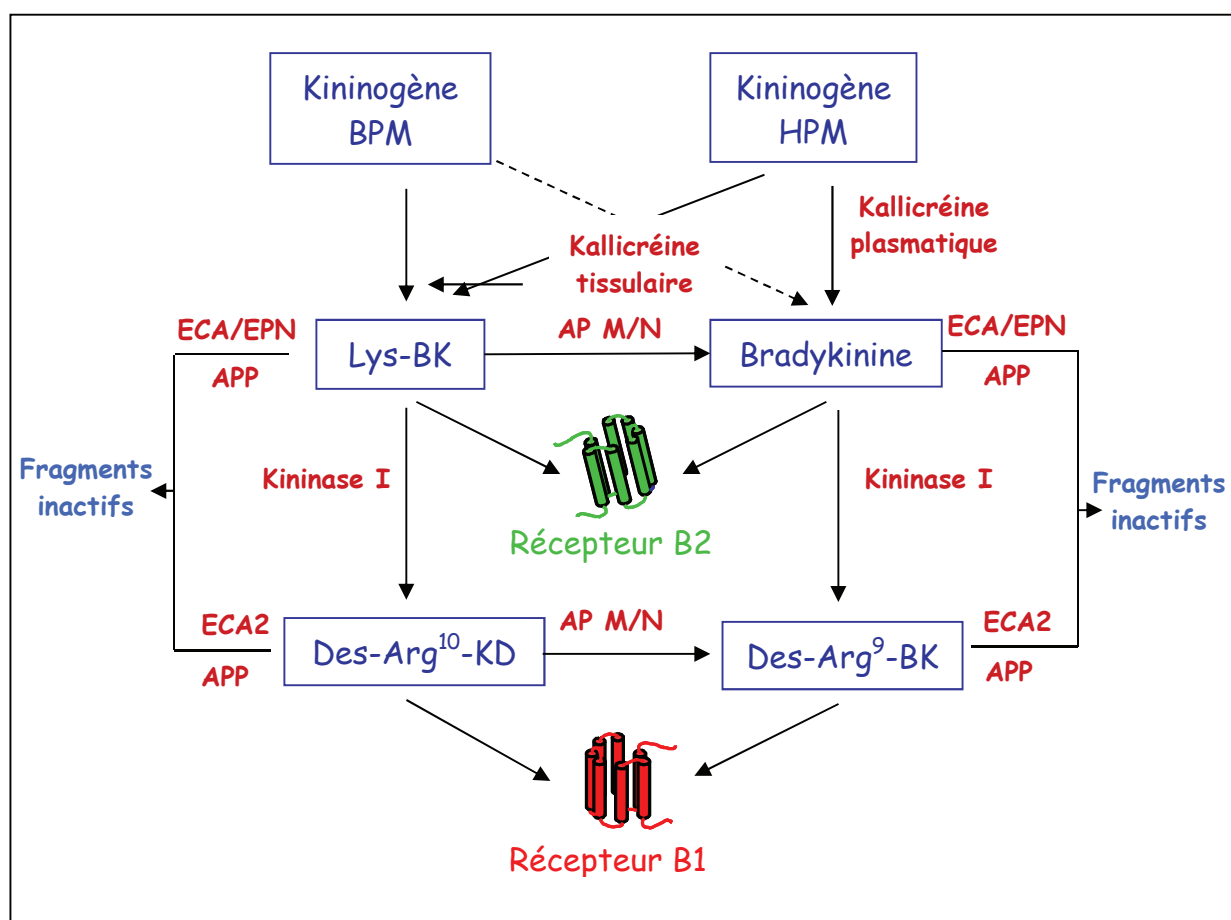


Figure 1 : Principales voies de synthèse et de dégradation des kinines. HPM : bas poids moléculaire ; HPM : haut poids moléculaire; Lys-BK : Lysyl-bradykinine ou kallidine (KD) ; ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine I ; EPN : Endopeptidase neutre ; APP : Aminopeptidase P ; AP M/N : carboxypeptidase M ou N.

2.3. Kinines

Les kinines appartiennent à une petite famille de peptides incluant la bradykinine (BK), la kallidine et leurs métabolites actifs dépourvus de l'arginine en position carboxyterminale (Figure 2).

	N-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 - C
Bradykinine (BK):		Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg-OH
Kallidine (KD) ou LysBK:		Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe-Arg-OH
desArg ⁹ -BK:		Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	-OH
desArg ¹⁰ -KD:		Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe-OH

Figure 2 : Séquence en acides aminés des principaux peptides naturels de la famille des kinines chez l'homme

Les kinines exercent leurs activités pharmacologiques en stimulant des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G : les récepteurs B2 (B2R) et B1 (B1R). La BK et la KD sont des agonistes endogènes des récepteurs B2 tandis que la des-Arg⁹-BK et la des-Arg¹⁰-KD sont les agonistes préférentiels des récepteurs B1. La spécificité pharmacologique de chacun de ces peptides réside dans leur partie carboxyterminale.

2.4. Kininases

Le temps de demi-vie des kinines dans le plasma est très court ; celui de la BK n'excède pas quelques secondes. En effet, les kinines subissent une dégradation métabolique rapide par des amino-, carboxy- et endopeptidases appelées kininases qui aboutissent à la production de plusieurs métabolites actifs ou inactifs. In vivo, quatre enzymes sont principalement impliquées dans cette dégradation : la kininase I qui regroupe les carboxypeptidases M et N, l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) ou kininase II, l'endopeptidase 24-11 ou endopeptidase neutre et l'aminopeptidase P (Figure 1). Il a été montré que l'ECA est la principale enzyme de dégradation des kinines chez l'homme dans le plasma (1). Ces kininases sont trouvées de façon ubiquitaire notamment dans les cellules endothéliales, les cellules de la bordure en brosse du tubule contourné proximal et du tubule distal rénal, et dans le sang.

La kininase I est une exopeptidase circulante synthétisée dans le foie (carboxypeptidase N), ou membranaire présente dans le rein, les poumons et l'endothélium vasculaire (carboxypeptidase M). Elle appartient à la famille des métalloprotéases à zinc. Cette enzyme est particulièrement importante car elle produit les seuls métabolites de la BK ou de la KD ayant une activité biologique significative, la des-Arg⁹-BK et la des-Arg⁹-K-BK respectivement. De plus, ces voies, physiologiquement mineures, deviennent importantes lorsque l'ECA est inhibée.

La kininase II, plus communément appelé l'ECA, codé par un seul gène, est une ectoenzyme membranaire. Elle est principalement exprimée au niveau de l'endothélium vasculaire pulmonaire mais également au niveau des cellules de la bordure en brosse du tubule contourné proximal et du tubule distal rénal, de l'intestin et du placenta. La BK circulante est donc principalement inactivée lors de son passage dans les poumons (2). L'ECA

représente l'enzyme majeure responsable de la dégradation des kinines *in vivo*. Elle agit comme une dipeptidylcarboxypeptidase en enlevant les deux acides aminés carboxyterminaux de la BK pour former la BK(1-7) puis la BK(1-5), peptides inactifs. Elle est également capable de métaboliser la kallidine et la des-Arg⁹-BK (3).

L'ECA est également une enzyme clé de l'activation du SRA. Elle catalyse en effet la conversion de l'angiotensine I inactive en angiotensine II, puissant octapeptide vasoconstricteur. Cependant, parmi tous ses substrats, c'est pour la BK que l'ECA présente la plus grande spécificité (4). Le SKK est donc couplé négativement au SRA par la kininase II qui active le SRA et inhibe le SKK. L'action vasomotrice des 2 systèmes dans un sens opposé en fait des systèmes de contre-régulation permettant de maintenir l'homéostasie vasculaire.

L'endopeptidase neutre (EPN) clive, comme la kininase II, la liaison Pro7-Phe8 de la bradykinine mais aussi la liaison Gly4-Phe5 (5). C'est une endopeptidase liée aux membranes cellulaires, présente en grande quantité sur l'épithélium du tubule proximal du néphron (6). Elle est ainsi la principale enzyme impliquée dans le métabolisme des kinines dans le rein. Au contraire de l'ECA, l'EPN ne joue pas de rôle au niveau plasmatique (7).

L'aminopeptidase P (APP) est une enzyme membranaire ou plasmatique formée par les cellules endothéliales. Elle clive le premier acide aminé de la BK pour former la BK(2-9). Elle constitue, au niveau du plasma, la principale enzyme de métabolisation de la des-Arg⁹-BK qu'elle dégrade en BK(2-8) (8).

Les aminopeptidases N et M (APN, APM) convertissent la kallidine et la des-Arg¹⁰-kallidine respectivement en bradykinine et en des-Arg⁹-BK.

2.5. Récepteurs des kinines

Les kinines et leurs métabolites actifs activent deux types de récepteurs, B1R et B2R. Ces récepteurs sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) (Figure 3). Ils sont codés par deux gènes différents chez tous les mammifères (9). Chez l'homme, ces gènes sont situés sur le chromosome 14, au niveau du même locus (14q32.1-q32.2). Le degré d'homologie de ces gènes est assez faible chez l'homme (36%) (10).

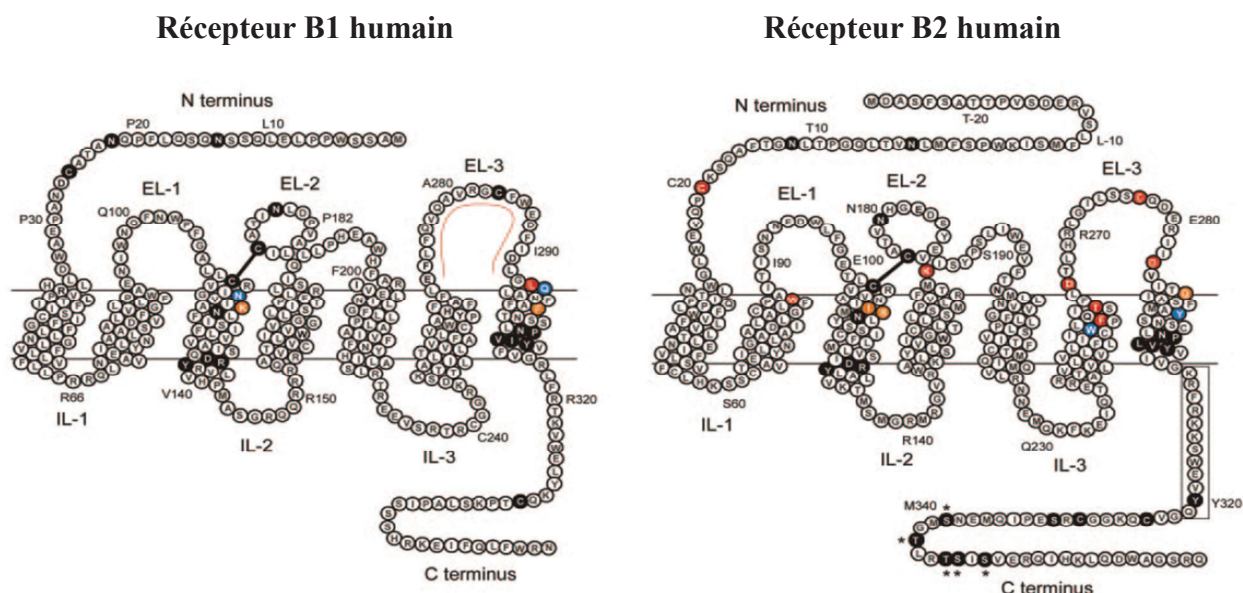


Figure 3 : Représentation schématique de la séquence peptidique des récepteurs B1 et B2 (D'après (9))

2.5.1. Le récepteur B2 des kinines

La structure du B2R est typique des RCPG, composé d'une chaîne polypeptidique simple traversant la membrane sept fois, avec un domaine amino-terminal extracellulaire, un domaine carboxy-terminal intracellulaire, 3 boucles intracellulaires et 3 boucles extracellulaires. Il est composé de 391 acides aminés chez l'homme (392 chez la souris). Le

gène humain *BDKRB2* présente une homologie de 80% avec le gène *Bdkrb2* du rat et de la souris.

Contrairement au récepteur B1 qui est inductible, l'expression du récepteur B2 est constitutive. Il a été identifié dans la plupart des tissus et plus particulièrement dans les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les cellules mésangiales, les cellules épithéliales, certains neurones, les astrocytes et les polynucléaires neutrophiles (11).

Au niveau cellulaire, la régulation de l'action du B2R se fait essentiellement par la BK. En effet l'activation du B2R par la BK conduit à une désensibilisation rapide de la cellule (12). En effet, la stimulation du B2R induit une internalisation rapide de celui-ci, impliquant la phosphorylation de résidus sérine et thréonine de l'extrémité C-terminale du récepteur (13). Cependant l'endocytose induite par la BK est rapidement suivie d'un recyclage du B2R vers la membrane (14). L'activation du B2R entraîne donc un cycle d'endocytose/réexpression membranaire suite à la phosphorylation/déphosphorylation du B2R. La stimulation chronique du B2R semble cependant diminuer son expression membranaire probablement du fait de modifications post-transcriptionnelles (15).

L'expression de B2R est régulée par son activation mais également par l'AMPc et IL1- β (16, 17). De plus, il a été mis en évidence au niveau du promoteur du gène *BDKRB2* des sites de liaisons à différents facteurs aussi divers que NF- κ B, l'activateur de l'IL-6, p53, et les estrogènes. Les cytokines pro-inflammatoires ont en effet montré leur capacité à induire une stimulation de l'expression du B2R dans différents modèles cellulaires (18, 19).

La transduction des signaux par le B2R est relayée par des systèmes de seconds messagers, différents selon le type cellulaire, via l'activation des protéines G (figure 4). Principalement impliqué dans la régulation du tonus vasculaire, l'activation du B2R au niveau de la cellule endothéliale aboutit à la production de facteurs vasodilatateurs : NO, EDHF

(facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium) et prostaglandines. Les principales voies de signalisation du B2R sont celles des RCPG : la voie des phospholipases et celle des cyclases. La première, impliquant la sous-unité $G\alpha_q$, conduit à l'activation des phospholipases A2 (PLA2), et C (PLC). La PLC stimule la production d'inositol 1,4,5 triphosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG) conduisant respectivement à une augmentation de calcium intracellulaire et à une activation de la protéine kinase C (PKC). L'augmentation du calcium intracellulaire conduit à la synthèse de NO via l'activation de la eNOS (endothelial NO synthase). La PKC potentialise l'action de la PLA2 qui libère l'acide arachidonique à l'origine de la production de prostaglandines (PGI2) et d'EDHF. Dans la voie des cyclases, l'activation de l'adénylate ou de la guanylate cyclases conduit à la production d'AMPc et de GMPc, puissants vasodilatateurs.

Outre ces voies classiques, le B2R serait également lié à d'autres voies de signalisation impliquées dans des phénomènes de prolifération, d'adhésion, de migration et d'apoptose cellulaire incluant l'activation de protéines à activité tyrosine kinase cytoplasmiques, l'activation des MAP-kinase (ERK1/2) et la voie JAK/STAT (9).

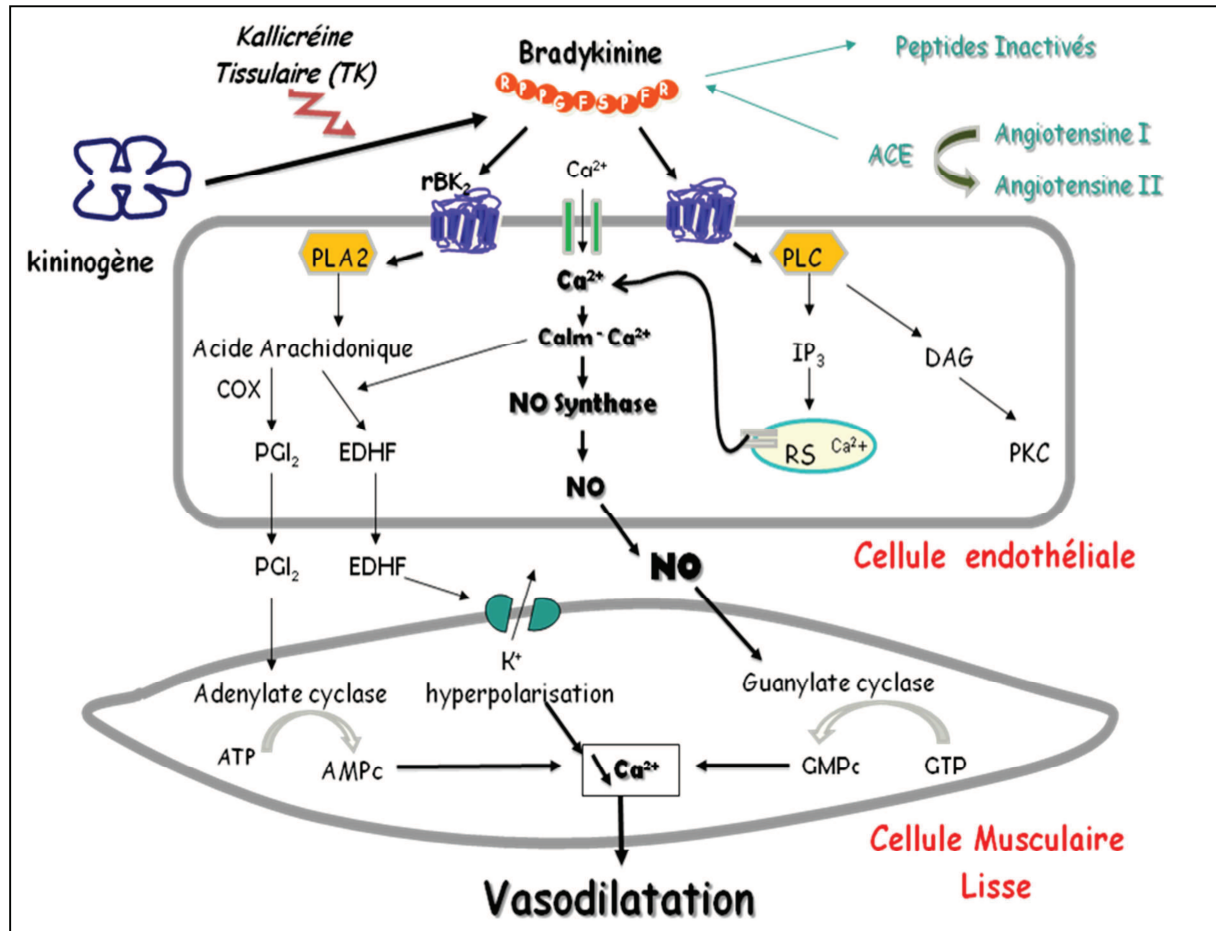


Figure 4 : Schéma de l'organisation moléculaire du SKK.

PLA₂ : Phospholipase A2, ACE : Enzyme de Conversion de l'Angiotensine, Ang I et II : Angiotensine I et II, PLC : Phospholipase C, IP₃ : Inositol Triphosphate, RS : Réticulum Sarcoplasmique, NO : Monoxyde d'azote ou Oxyde Nitrique, NOS : NO Synthase, Cox : Cyclo-oxygénase, PGI₂ : Prostacycline, Ca²⁺ : Calcium, K⁺ : Potassium.

2.5.2. Le récepteur B1 des kinines

Il s'agit également d'un récepteur à sept domaines transmembranaires. Le gène humain du B1R (*BDKRB1*) code pour un peptide de 353 acides aminés et sa séquence présente 70% d'identité avec le gène *Bdkrb1* du rat et de la souris. Contrairement au récepteur B2, le B1R n'est pas exprimé de façon constitutive dans les tissus sains sauf dans quelques espèces de mammifères comme le chat et le chien (20, 21). C'est en effet un récepteur essentiellement inductible dont l'expression est régulée. En effet, peu détectable dans les situations physiologiques, son expression est induite lors de phénomènes inflammatoires d'origines diverses. Il a ainsi été montré que les endotoxines bactériennes, les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β particulièrement), mais également le stress cellulaire et l'ischémie, étaient des stimuli induisant son expression (10). L'induction du B1R est médiée par les voies de signalisation des MAP-kinase et de NF- κ B (22, 23). Induit par l'inflammation, l'activation du B1R participe également à son amplification. Le B1R est en effet impliqué dans le recrutement des cellules mononuclées (polynucléaires, monocytes) sur le site inflammatoire et des souris déficientes en B1R présentent une altération de la réponse inflammatoire cellules-dépendante (24, 25).

Une autre différence du B1R avec le B2R est sa quasi absence de désensibilisation après stimulation. Le B1R ne possède en effet pas les résidus sérines et thréonines sur son extrémité C-terminale, et il n'est ainsi jamais phosphorylé même en présence d'agonistes (26).

Bien que moins bien exploré, il semble que le B1R partage les mêmes voies de signalisation que le B2R. Cependant, la finalité de cette signalisation est différente. En effet, alors que l'activation du B2R conduit à une augmentation transitoire du calcium intracellulaire, l'activation du B1R entraîne une élévation soutenue, en plateau, du calcium intracellulaire (27). La régulation distincte des récepteurs sur le court-terme (internalisation et désensibilisation rapide pour le B2R) est probablement à l'origine de cette différence d'effet.

	B1R	B2R
Famille	Récepteur couplé aux protéines G	Récepteur couplé aux protéines G
Mode d'expression	Inductible	Constitutif
Localisation	Cellules endothéliales, cellules mésangiales, fibroblastes, muscle lisse	Ubiquitaire
Désensibilisation	Non	Oui
Internalisation	Non	Oui
Agonistes préférentiels	Des-arg ⁹ -Bradykinine Des-arg ¹⁰ -Kallidine	Bradykinine Kallidine

Tableau 1 : Résumé des propriétés des récepteurs B1 et B2 des kinines

En résumé, le SKK forme donc un système peptidique complexe dont l'activité principale est une action de régulation du tonus vasculaire via son action sur l'endothélium (tableau 1). Les peptides effecteurs, les kinines, agissent principalement via leur récepteur B2, constitutif. Le récepteur B1 est, lui, activé dans plusieurs situations physiopathologiques et notamment le diabète. Il est principalement régulé par l'ECA qui couple négativement le SKK au SRA. Le SKK est fortement impliqué dans les mécanismes pathologiques à l'origine des pathologies cardiovasculaires. Il est également impliqué dans diverses pathologies : rénales, inflammatoires, la régulation de la douleur, les maladies respiratoires, les cancers et l'angiooedème. Ces effets, bénéfiques ou délétères sont fonctions de l'induction et de l'activation de ses deux types de récepteurs B1 et B2. Le SKK est également impliqué dans le diabète et ses complications.

CHAPITRE II : LE DIABETE

Le diabète est une maladie chronique touchant le métabolisme glucidique et entraînant un défaut du maintien de l'homéostasie glucidique dans l'organisme. Ce défaut de régulation conduit à une hyperglycémie (élévation du taux plasmatique de glucose). Le diabète chez l'homme est défini biologiquement par la présence de 2 glycémies veineuses à jeun supérieur à 1.26 g/l (7 mmol/l) ou une glycémie supérieure à 2.00 g/l (11.1 mmol/l) 2 heures après une hyperglycémie provoquée par voie orale à 75 g de glucose.

1. EPIDEMIOLOGIE

Le diabète représente actuellement un grave problème de santé publique en France et dans le monde où sa prévalence ne cesse d'augmenter. Ainsi, le diabète touche actuellement près de 3 millions de personnes en France et plus de 382 millions dans le monde soit 8.3% de la population mondiale. Les estimations de prévalence en 2035 sont de plus de 582 millions de personnes atteintes soit 8,9% de la population.

La gravité du diabète est principalement liée à ses complications chroniques. En effet, même si une hyperglycémie très importante peut conduire à des désordres métaboliques aigus potentiellement mortels, la prise en charge actuelle permet le plus souvent de les éviter. La chronicité de l'hyperglycémie (plus ou moins bien équilibrée), conduit aux développements de complications multiples aux conséquences finales toujours très délétères pour le patient. Ainsi, le diabète était la 8^{ème} cause de mortalité dans le monde en 2011. Le diabète a été responsable de 4.8 millions de décès dans le monde en 2012. La sévérité des complications et l'augmentation de la prévalence de la maladie est également responsable d'une augmentation des coûts de prise en charge des patients diabétiques. En France, le total des remboursements versés par l'Assurance maladie aux personnes traitées pour diabète s'élevait en 2007 à 12.5

milliards d'euros, coût en augmentation de 10% par an. Dans le monde, le coût des dépenses de santé imputables au diabète est estimé à 548 milliards d'USD en 2013. La prise en charge des patients diabétiques et notamment la prise en charge de leurs complications représente un poids important en termes de santé publique. Le diabète représente donc aujourd'hui non seulement un enjeu de santé publique, mais aussi un enjeu économique.

2. PHYSIOPATHOLOGIE

Le diabète regroupe plusieurs pathologies de pathogénies différentes ayant pour origine un trouble de la sécrétion et/ou de l'action de l'insuline, hormone hypoglycémiante de l'organisme. On distingue principalement le diabète de type 1 (DT1) et le diabète de type 2 (DT2), anciennement appelés diabète insulinodépendant et diabète non-insulinodépendant. Ce dernier est le plus répandu ; les diabétiques de type 2 représentent environ 85% du nombre total de diabétiques.

2.1. Diabète de type 1

Le diabète de type 1 représente environ 10 % des cas de diabète observés dans le monde, bien loin derrière le DT2 (non insulinodépendant). L'OMS estime à 10 à 15 millions le nombre de diabétiques de type 1 dans le monde. De plus, pour des raisons par encore très bien comprises mais probablement liées aux modifications du mode de vie, l'incidence du diabète de type 1 augmente chaque année de 3 à 4% par an (28).

Le DT1 est une maladie auto-immune caractérisée par une réaction d'inflammation locale qui a lieu dans et autour des îlots de Langerhans. L'inflammation des îlots ou insulitis est suivie par une destruction des cellules β sécrétrices d'insuline. La destruction de ces cellules pancréatiques a pour conséquence une insulino-pénie à l'origine de l'hyperglycémie. Elle

apparaît lorsqu'il ne reste que 10-20% des cellules β fonctionnelles. La maladie apparaît souvent chez des sujets jeunes (une fois sur deux avant 20 ans). Le facteur déclenchant de la maladie n'est actuellement pas bien identifié, même si les mécanismes immunitaires complexes conduisant à la destruction des cellules β sont de mieux en mieux connus. Le DT1 survient sur un terrain génétique prédisposant. Plus de 20 gènes ont été retrouvés, une estimation probablement basse. Le plus important est localisé dans le système HLA (une région génétique qui contrôle le rejet des greffes, une autre conséquence de l'activation des lymphocytes T). Des facteurs environnementaux, par exemple des virus, sont probablement impliqués dans le déclenchement de la maladie qui conduit à l'activation initiale des lymphocytes T. Mais aucun n'a à ce jour été clairement identifié. D'autres facteurs d'environnement, en particulier infectieux, ont paradoxalement un effet protecteur vis-à-vis du diabète. Il n'existe actuellement pas de traitement définitif du diabète de type 1 permettant la guérison. Plusieurs essais thérapeutiques ont tenté de prévenir la maladie mais ont pour l'instant échoué (29). C'est donc une maladie chronique, nécessitant un traitement à vie par insuline.

2.2. Diabète de type 2

L'incidence du DT2 est croissante et on parle actuellement de véritable épidémie tant les prévisions de prévalence sur les prochaines années sont alarmantes. Le DT2 est en effet un problème de santé grave et répandu dans l'ensemble des pays du monde. Cette explosion des cas de DT2 s'explique par des raisons sociologiques : mode de vie, alimentation, obésité, des facteurs de risques propres aux sociétés industrialisées, mais aussi par des raisons démographiques : allongement de l'espérance de vie, meilleur dépistage de la maladie.

Le DT2 survient sur un terrain prédisposé, sous l'influence de facteurs environnementaux et donc souvent après 50 ans. Il est souvent associé à d'autres facteurs de risque

cardiovasculaires dont il partage certaines causes comme l'hypertension artérielle et la dyslipidémie.

La pathogenèse du DT2 est plus complexe que celle du DT1 car elle implique de nombreux tissus et de nombreux mécanismes physiopathologiques. Le DT2 possède schématiquement deux composantes principales : une insulino-résistance, nécessitant des besoins accrus en insuline pour maintenir une glycémie normale, et un trouble de l'insulinosécrétion, qui ne permet pas à l'organisme de compenser l'augmentation des besoins. Il existe donc une inadaptation de la production d'insuline (défaut des cellules β du pancréas) par rapport aux besoins des tissus cibles qui ont augmentés car devenus résistants à l'insuline (insulino-résistance). Autrement dit, l'insuline continue à être sécrétée par les cellules β du pancréas, mais en quantité insuffisante face à une demande accrue. La résistance à l'action de l'insuline explique que l'hormone ne parvienne plus à assurer l'entrée du glucose dans les cellules et son utilisation. Il en résulte des dysfonctionnements cellulaires, le glucose étant le principal substrat énergétique des cellules dans les conditions habituelles de vie.

Les mécanismes à l'origine de l'insulino-résistance et du déficit d'insulinosécrétion sont complexes, multiples et partiellement compris. L'insulino-résistance résulte de l'interaction entre une susceptibilité génétique et des facteurs d'environnement (augmentation des apports caloriques et lipidiques et diminution de l'activité physique). Ces facteurs environnementaux sont responsables de l'accumulation de lipides dans le tissu adipeux viscéral, le foie, le muscle et le pancréas, à l'origine de phénomènes cellulaires délétères (inflammation, stress du réticulum endoplasmique, stress oxydant,...) conduisant à la fois à une diminution du signal insulinique au niveau des organes cibles (foie, muscle, tissu adipeux) et à une toxicité sur les cellules β entraînant des troubles de sécrétion de l'insuline au niveau pancréatique. La capacité des cellules β à répondre à ce stress métabolique (augmentation des besoins, toxicité

cellulaire) est déterminée génétiquement. Ainsi la combinaison de l'augmentation des besoins en insuline et un environnement toxique entraînent sur des cellules β « fragiles » génétiquement, un dysfonctionnement et une diminution de leur masse. L'ensemble de ces phénomènes conduit progressivement à une intolérance au glucose, puis, finalement, au développement du DT2 (30).

3. COMPLICATIONS

Les perturbations du métabolisme glucidique représentent le fondement biologique essentiel de la maladie diabétique. L'hyperglycémie est à l'origine d'une toxicité pour un grand nombre de tissus. L'hyperglycémie chronique est ainsi associée à terme à des complications organiques spécifiques.

La gravité du DT2 est ainsi liée à ces complications. En effet, l'hyperglycémie chronique est extrêmement délétère à long terme pour la cellule, entraînant de nombreux mécanismes adaptatifs délétères pour le fonctionnement des organes atteints. La principale cible des complications de l'hyperglycémie chronique est l'endothélium vasculaire, tissu en interface constante avec le plasma hyperglycémique. Ainsi on sépare schématiquement les complications du diabète en deux types en fonction du diamètre des vaisseaux atteints: micro et macrovasculaires. Les complications microvasculaires touchent la rétine, le rein. Les complications macrovasculaires sont celles de l'athérosclérose et touchent donc les coronaires, les artères à visée cérébrale et les artères des membres inférieurs. Le diabète touche également les nerfs conduisant à la neuropathie diabétique. Celle-ci est traditionnellement classée avec les complications microvasculaires même si les anomalies qui en sont à l'origine n'impliquent pas le vaisseau mais directement les différents types de cellules nerveuses (31).

Le risque de survenue des complications du diabète, surtout des complications microvasculaires, est dépendant de la durée d'exposition et de la sévérité de l'hyperglycémie. Il a bien été montré que le risque de complications augmente avec le temps et avec le taux d'hémoglobine glyquée (32).

3.1. Physiopathologie

Les mécanismes précis à l'origine de la survenue des complications du diabète ne sont pas totalement compris. Il semble clair actuellement que la pathogénèse des complications du diabète soit liée à un déséquilibre entre des mécanismes moléculaires délétères et des facteurs endogènes protecteurs. De nombreuses anomalies touchant la signalisation cellulaire, l'expression génique, et la régulation de la biologie cellulaire ont été décrites dans le diabète. Il semble probable que l'ensemble de ces mécanismes délétères sont intriqués et qu'ils concourent ensemble au développement des complications micro et macrovasculaires du diabète (33).

M. Brownlee a développé une théorie unificatrice de la pathogénèse des complications faisant intervenir la mitochondrie et le stress oxydatif comme acteurs principaux (34). Ainsi, l'hyperglycémie au niveau cellulaire entraînerait une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène d'origine mitochondriale. Ce stress oxydant induit par l'hyperglycémie serait alors à l'origine d'une inhibition de la voie de la glycolyse, dérivant le métabolisme du glucose vers quatre voies métaboliques délétères : la voie des polyols, les produits avancés de la glycation, l'activation de la protéine kinase C et la voie des hexosamines. Chacune de ces voies induit des anomalies cellulaires importantes et est impliquée dans la survenue et le développement des complications du diabète.

D'autres mécanismes sont également impliqués. Le diabète induit l'activation du SRA conduisant à l'augmentation de la production d'angiotensine II jouant un rôle majeur dans la

pathogénèse de la néphropathie et de la cardiopathie diabétique (35 , 36). Le stress du réticulum endoplasmique (défaut de gestion des modifications post-traductionnelles des protéines dans le réticulum endoplasmique), impliqué dans la physiopathologie de l'insulinorésistance, a été également impliqué dans la pathogénèse de l'athérosclérose et de la néphropathie diabétique (37 , 38).

3.2. Complications microvasculaires

Les complications microvasculaires sont des pathologies spécifiques du diabète. Elles sont observées au niveau de tous les organes, mais ont une traduction clinique pour la vascularisation rétinienne (rétinopathie diabétique), rénale (néphropathie diabétique) et nerveuses (neuropathie diabétique).

Les complications microvasculaires sont, comme le diabète, parfaitement asymptomatiques jusqu'à leur stade avancé ou il est souvent trop tard pour intervenir. Ainsi, la prévention et la prise en charge précoce de ces complications nécessite leur dépistage systématique chez tous les diabétiques. La principale mesure de prévention est l'amélioration de l'équilibre glycémique qui doit être le plus parfait possible. L'équilibration tensionnelle joue également un rôle dans la prévention.

3.2.1. Rétinopathie diabétique

La rétinopathie diabétique est la complication microvasculaire la plus spécifique du diabète. Sa prévalence est fortement liée à la durée d'exposition au diabète et au niveau de l'hyperglycémie. L'incidence et le risque de progression de la rétinopathie diabétique ont tous deux diminué au cours des 30 dernières années, passant de près de 90% à moins de 50%. Les patients diabétiques ont actuellement un risque beaucoup plus faible de rétinopathie diabétique proliférante, d'œdème maculaire, ou de déficience visuelle. Cependant, la

rétinopathie diabétique reste la cause la plus fréquente de cécité chez l'adulte dans les pays industrialisés. Il est à noter également que le diabète est un facteur de risque pour le glaucome et la cataracte, qui se produisent plus tôt et plus fréquemment chez les diabétiques.

La rétinopathie diabétique est liée à une maladie de la vascularisation rétinienne caractérisée à la fois par des occlusions et des fuites des vaisseaux rétiens. Ces atteintes conduisent à des phénomènes œdémateux (l'œdème maculaire) et ischémiques responsables d'une néovascularisation rétinienne anarchique (rétinopathie proliférante). En plus de cette atteinte artérielle, il existerait une atteinte neurosensorielle difficilement détectable chez l'homme (39).

3.2.2. Néphropathie diabétique

La néphropathie diabétique est une des causes principales d'insuffisance rénale terminale. Elle touche actuellement 20 à 40% des patients diabétiques. La progression de la néphropathie est lente jusqu'au stade terminal de l'insuffisance rénale. La première anomalie dépistable de l'atteinte rénale du diabète est la microalbuminurie. La microalbuminurie témoigne donc d'une atteinte rénale débutante mais également de l'atteinte vasculaire liée au diabète. En effet, la présence d'une microalbuminurie est associée à un risque cardiovasculaire majeur chez les patients diabétiques (40).

L'histoire naturelle de la néphropathie diabétique est classiquement représentée en 5 stades décrit initialement par Mogensen (41). Le premier stade de la néphropathie diabétique est caractérisé par une hyperfiltration glomérulaire secondaire à une diminution des résistances artériolaires avec baisse de près de 50% de la résistance de l'artère glomérulaire afférente alors que la résistance de l'artère glomérulaire efférente est pratiquement inchangée. Le deuxième stade est marqué par l'apparition de lésions histologiques précoces (épaississement des membranes basales et expansion des cellules mésangiales) sans

symptômes cliniques, ni anomalie de l'excrétion urinaire d'albumine. Le stade 3 de la néphropathie diabétique correspond à l'apparition d'une microalbuminurie (soit une excrétion urinaire d'albumine de 30 à 300mg/24h). Le stade suivant, 4, correspond à une protéinurie permanente non sélective (supérieure à 300mg/24h). La néphropathie est bien établie et les fonctions rénales commencent à décliner, le débit de filtration glomérulaire diminuant régulièrement. Le glomérule présente une expansion de la matrice mésangiale, une hypertrophie des cellules mésangiales, un épaississement de la membrane basale, une réduction de la surface de filtration et de la lumière capillaire. On observe également une diffusion des lésions glomérulaires, une glomérulosclérose nodulaire et des lésions exsudatives. Le dernier stade est un stade d'insuffisance rénale terminale avec obstruction glomérulaire. C'est le stade où la suppléance rénale s'impose (Dialyse/greffe).

L'apparition d'une microalbuminurie au stade 3 traduit des modifications hémodynamiques et une altération de la barrière de filtration glomérulaire (épaississement et modification de composition de la membrane basale glomérulaire, atteinte podocytaire) (42). En parallèle de l'atteinte glomérulaire, on observe également des anomalies tubulaires et tubulointerstitielles pouvant également participer à l'apparition de la microalbuminurie. L'hyperglycémie induit également des signaux pro-inflammatoires et profibrotiques provoquant une expansion mésangiale par accumulation de matrice extracellulaire. A un stade avancé, il existe une apoptose des podocytes et des cellules endothéliales glomérulaires avec glomérulosclérose concomitante d'un déclin de la fonction rénale.

Les déterminants de l'apparition et de l'évolution de la néphropathie diabétique sont multiples. Le niveau d'hyperglycémie et la durée d'exposition à l'hyperglycémie sont les principaux déterminants. Mais d'autres facteurs vont également influencer sur la néphropathie diabétique. L'équilibre tensionnel d'abord, puisque le glomérule est très sensible aux variations de pression artérielle. Il existe également un déterminisme génétique de la

néphropathie diabétique. Le polymorphisme insertion/délétion du gène de l'ECA, à l'origine d'une variation des taux plasmatique d'ECA, est ainsi associé au risque de développer une néphropathie diabétique chez les patients diabétiques de type 1 (43-45). Ces études ont en effet mis en évidence un effet protecteur récessif de l'allèle insertion.

3.3. Complications macrovasculaires

Les complications macrovasculaires sont liées au développement de la maladie athéromateuse chez le diabétique. Bien que la maladie athéromateuse du diabétique soit similaire à celle des patients non diabétiques, l'hyperglycémie est un facteur de risque cardiovasculaire majeur. La première cause de mortalité chez le diabétique est d'origine cardiovasculaire (infarctus du myocarde, accident ischémique cérébral, artériopathie des membres inférieurs)(32).

Les anomalies métaboliques qui accompagnent le diabète sont responsables d'une dysfonction artérielle qui favorise de l'athérosclérose. Ces anomalies métaboliques incluent l'hyperglycémie chronique, mais également la dyslipidémie et l'insulinorésistance chez le diabétique de type 2. Les cibles du diabète dans la maladie artérielle sont multiples. En effet, il altère les fonctions de multiples types cellulaires, aussi bien de la paroi artérielle que du système sanguin. Le diabète est ainsi à l'origine d'une dysfonction endothéliale par diminution de la production de NO endothéliale. Il induit des phénomènes inflammatoires au niveau de la paroi artérielle, mécanisme fondamental de l'initiation de l'athérosclérose. Les anomalies lipidiques associées au diabète participent à la majorité des phénomènes impliqués dans l'athérogénèse. De plus, l'hyperglycémie augmente l'activation plaquettaire et diminue les inhibiteurs endogènes de l'activité plaquettaire, conduisant à un état prothrombotique des patients diabétiques (46).

* * *

En résumé, le diabète est une pathologie complexe, souvent multifactorielle et dont les mécanismes ne sont pas encore tous bien compris. L'augmentation continue de la prévalence du diabète en fait une véritable épidémie dans le monde. La sévérité de ses complications, touchant une multitude d'organes, en font un problème majeur de santé publique. La gravité de la pathologie, sa prévalence croissante mais également le coût engendré par sa prise en charge, rendent nécessaire des moyens de prévention et de réduction des complications. En plus des mesures indispensables de prévention liées aux facteurs environnementaux, la compréhension des mécanismes physiopathologiques et le développement de nouvelles approches pharmacologiques peut permettre une amélioration des conséquences de cette « épidémie ».

CHAPITRE III : SYSTEME KALLICREINE KININES ET DIABETE

Les liens entre SKK et diabète sont nombreux. Le diabète influence l'expression et la signalisation des récepteurs des kinines qui sont impliqués de façon bénéfique ou délétère dans la survenue des complications du diabète mais également dans la survenue du diabète en lui-même. Ce chapitre abordera de façon concise les relations entre diabète et SKK, les chapitres d'expérimentation revenant en détails sur certains points.

Le SKK a été impliqué dès les années 1980 dans la pathogénèse du diabète notamment du DT2 (47). Cette partie sera développée dans le chapitre IV lequel comprend les expériences que nous avons effectuées concernant ce lien.

Le SKK est également impliqué dans la survenue et la physiopathologie de l'ensemble des complications du diabète. En effet, il existe des données expérimentales mettant en évidence un lien entre le SKK et les complications microvasculaires du diabète (rétinopathie diabétique, neuropathie diabétique, néphropathie diabétique) et les complications cardiovasculaires (ischémie périphérique et cardiaque, cardiopathie diabétique). Il est également à noter que le diabète induit une expression du B1R dans différents organes et tissus, le cœur, le rein, le système nerveux, la rétine, tous cibles pathologiques de l'hyperglycémie. Nous détaillerons ici uniquement les liens entre complications microvasculaires du diabète et SKK. Le lien entre lésions cardiovasculaires et SKK seront détaillés dans le chapitre V.

1. SYSTEME KALLICREINE-KININES ET RETINOPATHIE DIABETIQUE

Les divers composants du SKK (TK, B2R, B1R) sont exprimés au niveau oculaire, pas seulement au niveau vasculaire mais également dans la rétine, la choroïde, et les corps ciliaire chez l'homme (48). Au cours du diabète, il existe une surexpression du B1R et une surexpression plus transitoire du B2R dans la rétine de rats diabétiques (diabète induit par streptozotocine) (49, 50 , 51). Cette régulation n'est cependant pas retrouvée chez la souris (52). Chez l'homme atteint de rétinopathie diabétique, les études sur la présence de TK dans le vitrée sont discordantes (53 , 54). En revanche la présence de la PK et du KHPM a bien été mis en évidence (55 , 56).

Les résultats des études cliniques de traitement par les inhibiteurs de conversion de l'angiotensine (IEC) sur la rétinopathie diabétique semblent mettre en évidence un effet bénéfique mais faible de l'inhibition de l'enzyme de conversion sur la rétinopathie diabétique (57, 58). Les IEC inhibant le SRA mais activant le SKK, ce dernier pourrait donc avoir un rôle dans cet effet bénéfique même modeste. Cependant, chez la souris diabétique, l'inhibition du B2R ne modifie pas l'effet bénéfique des IEC observé sur la néovascularisation rétinienne (52).

Les arguments expérimentaux semblent plutôt en faveur d'un effet délétère du SKK sur la rétinopathie diabétique. L'activation du B2R a en effet des effets vasodilatateurs et proangiogéniques, deux mécanismes impliqués dans la pathogénèse de la rétinopathie diabétique (hyperperméabilité vasculaire et néovascularisation) (59). Ainsi, l'inhibition chronique des deux récepteurs ou du B1R seul diminue l'extravasation plasmatique

rétinienne, l'inflammation rétinienne et le stress oxydant induit par le diabète (49 , 50 , 56). De même, l'inhibition de la PK a des effets bénéfiques sur la dysfonction rétinienne diabétique (60). Le SKK pourrait donc être une cible thérapeutique intéressante pour réduire le développement des complications rétinienne du diabète chez l'homme mais qui reste à confirmer.

2. SYSTEME KALLICREINE-KININES ET NEPHROPATHIE DIABETIQUE

La littérature sur le SKK dans le rein et notamment la néphropathie diabétique est abondante. Le rein possède en effet tous les composants du SKK pouvant ainsi fonctionner dans un mode paracrine sur les fonctions glomérulaires et tubulaires (61). Il est à noter que les reins produisent localement des kinines à des taux plus élevés que ceux présents dans le sang. Le B2R est largement distribué dans les différentes structures du rein chez le rat, aussi bien glomérulaires (podocytes, cellules mésangiales) que tubulaires au niveau des régions apicales et basales des tubules proximaux et distaux et du canal collecteur (62 , 63 , 64). Le B1R est également exprimé dans différentes structures du rein après induction par des stimuli inflammatoires (65). Le diabète augmente l'expression des ARNm des 2 récepteurs au niveau rénal (66). Les premiers et principaux arguments du rôle bénéfique du SKK dans la néphropathie diabétique proviennent des données issues des études pharmacologique et génétique ciblant l'ECA.

2.1. Effet néphroprotecteur des inhibiteurs de l'ECA

La première démonstration d'un effet potentiel de l'ECA dans la néphropathie diabétique réside dans l'effet néphroprotecteur des inhibiteurs compétitifs de cette enzyme. Les IEC ont été développés en première intention pour le traitement de l'hypertension

artérielle. Plusieurs indications thérapeutiques additionnelles ont été depuis identifiées, les IEC se sont notamment avérés des médicaments particulièrement efficaces pour retarder l'évolution de la néphropathie diabétique.

En 1986, Zatz et collaborateurs font l'observation fondamentale selon laquelle un inhibiteur de l'ECA protège contre le développement d'une microalbuminurie et de lésions glomérulaires structurales dans le diabète expérimental (67). Des études cliniques ont par la suite confirmé le bénéfice des IEC dans la protection de la fonction rénale à la fois chez le diabétique de type 1 (68 , 69) et de type 2 (70).

Malgré son fort potentiel néphroprotecteur, le blocage de l'ECA par les IEC ne présente pas un bénéfice égal chez tous les individus diabétiques. Ceci a été attribué en partie à des facteurs génétiques mettant ainsi en avant le concept de pharmacogénétique. Un de ces facteurs est le polymorphisme d'insertion/délétion du gène de l'ECA.

2.2. Rôle du polymorphisme de l'ECA dans la néphropathie diabétique

L'activité de l'ECA dépend de variations de la séquence nucléotidique de l'ADN de son gène. En effet, en 1990, Rigat et al. décrivent pour la première fois chez l'homme un polymorphisme génique de type insertion/délétion (I/D) de l'ECA à l'origine de la grande variabilité interindividuelle des taux plasmatiques de l'enzyme (71). Il consiste en la présence (insertion, I) ou l'absence (délétion, D) d'un fragment d'ADN de 287 paires de bases au niveau de l'intron 16 du gène codant pour l'ECA. Ce polymorphisme détermine la moitié de la variance de l'activité circulante de cette enzyme dans la population générale (72). Chez les sujets homozygotes (D/D) pour l'allèle D, les taux plasmatiques sont environ deux fois supérieurs à ceux mesurés chez les sujets homozygotes (I/I) pour l'allèle I, et les valeurs sont

intermédiaires chez les sujets hétérozygotes (I/D) (soit I/I, 76% ; I/D, 100% ; D/D, 126% en moyenne) (71). Par ailleurs il a été montré que l'activité de l'ECA plasmatique est importante chez les sujets D/D, faibles chez les sujets I/I et intermédiaires chez les sujets I/D.

Ce polymorphisme a, entre autres impacts physiopathologiques, été associé au développement de la néphropathie diabétique. L'étude d'une telle association a été envisagée en raison des hypothèses concernant le rôle physiologique particulier du SRA et de l'ECA sur l'hémodynamique rénale. De plus, il a été montré que les taux plasmatiques et l'activité de l'ECA étaient élevés chez les patients diabétiques de type 1, particulièrement chez les sujets micro- et macro-albuminuriques (73, 74).

Cette association entre le polymorphisme de l'ECA et la susceptibilité à développer une néphropathie diabétique a été proposée pour la première fois en 1994 chez des diabétiques de type 1 (43-45). Ces études ont mis notamment en évidence un effet protecteur récessif de l'allèle I. Du fait du petit nombre de sujets, ces études cas-témoins, ont par la suite été âprement discutées (75, 76). L'association du polymorphisme de l'ECA et la néphropathie diabétique a depuis été confirmée par des méta-analyses indépendantes (77, 78) et des études prospectives ou de cas-contrôles (79, 80) qui ont mis en évidence un effet délétère de l'allèle D de l'ECA dans l'apparition et la progression de la néphropathie diabétique dans le diabète de type 1. Une étude a par ailleurs montré que l'allèle D était un facteur de risque indépendant des autres facteurs de risque déjà établis comme l'hypertension et l'hyperglycémie mal contrôlée chez les diabétiques de type 1 (81). De plus, il a été montré expérimentalement qu'une augmentation du niveau d'ECA par augmentation du nombre de copies du gène était associée à une aggravation de la néphropathie diabétique chez la souris (82).

Dans le DT2, cette association entre le polymorphisme I/D de l'ECA et la néphropathie diabétique n'est en revanche pas évidente car les principales études sur le sujet se sont révélées divergentes (76, 83-85). Il est intéressant de noter qu'une méta-analyse a

montré que ce polymorphisme contribue à la susceptibilité génétique à la néphropathie diabétique dans les populations asiatique et caucasienne diabétiques de type 2 mais de façon moins marquée chez les caucasiens (78).

2.3. Rôle du SKK dans la néphropathie diabétique

Si l'ECA joue un rôle dans le développement de la néphropathie diabétique, il est probable que celui-ci soit lié en partie à son action sur le SKK. Il a ainsi été montré dans un modèle expérimental murin de diabète de type 2 que l'effet néphroprotecteur des IEC était médié par l'activation du B2R (86). De même, le polymorphisme de l'ECA module le métabolisme de la BK avec une augmentation significative de la BK pour de faible augmentation de l'ECA (87, 88). L'activation du SKK par les IEC peut se faire par plusieurs mécanismes intriqués et additionnels : inhibition de la dégradation de la BK, mais également formation d'angiotensine 1-7 et formation d'un complexe protéique ECA/B2R (89). En effet, un traitement par IEC entraîne l'accumulation d'angiotensine I dégradée en angiotensine 1-7. L'angiotensine 1-7 induit des effets hypotenseurs et vasodilatateurs qui s'opposent à ceux de l'angiotensine II par des mécanismes inhibés par des antagonistes du B2R, impliquant donc son activation (90). L'angiotensine 1-7 peut également se comporter comme un inhibiteur de l'ECA (91). De plus, l'ECA et le B2R seraient capables de former un complexe membranaire qui augmenterait la sensibilité du B2R pour la BK (92).

De façon plus directe, il a été montré que l'inhibition du SKK, par des approches pharmacologiques ou de déficiences génétiques, aggrave la néphropathie diabétique. Ainsi, l'inactivation génétique du SKK (déficiency en TK ou en B1R et B2R simultanément) aggrave les lésions rénales secondaires à l'hyperglycémie chronique (66, 93). Cet effet bénéfique semble être principalement lié à l'action du B2R puisque la déficiency en B2R

accentue les atteintes rénales avec un degré de sclérose mésangiale et une albuminurie plus important (94). Le rôle du B1R dans cette pathologie est quant à lui moins bien connu. Cependant, on peut noter que les lésions histologiques rénales ainsi que l'excrétion urinaire d'albumine sont plus importantes en cas de déficience combinée des deux récepteurs qu'en cas de déficience en B2R seule. Ces observations suggèrent donc que l'augmentation de l'expression du B1R induite chez les souris déficiente en B2R a un effet protecteur (95).

L'apparition de la fibrose est une étape clé du développement de la néphropathie diabétique conduisant à terme à une glomérulosclérose généralisée et donc à l'insuffisance rénale terminale. Plusieurs études ont mis en évidence un rôle du B2R dans le développement de la fibrose rénale dans des modèles diabétiques ou non diabétiques. L'activation du B2R aurait ainsi une action antiproliférative sur les cellules mésangiales (96). Plus récemment, Blaes et al. ont montré que l'absence de B2R aggravait l'expansion mésangiale chez des souris diabétique et que l'activation du B2R réduisait la synthèse de collagène par des cellules mésangiales cultivées dans un milieu riche en glucose (97). Le B1R semble avoir un rôle délétère dans la fibrose rénale, probablement du fait de son rôle dans les processus inflammatoires (98, 99). Cependant son rôle n'a pas été étudié spécifiquement dans la néphropathie diabétique.

L'effet bénéfique du SKK sur la néphropathie diabétique met probablement en jeu plusieurs mécanismes. Le SKK pourrait exercer ses effets bénéfiques par la réduction du stress oxydant ainsi que par l'activation de la production de NO.

Le stress oxydatif a été identifié parmi les événements critiques qui contribuent au développement et à la progression de la ND. La BK est capable de réduire le niveau de stress oxydant chez des rats diabétiques (100). De plus, une augmentation des niveaux de stress oxydant a été décrite chez des souris diabétiques déficientes en B2R et déficiente en B1R et B2R (93). Une diminution du métabolisme du NO est également impliquée dans le

développement de la néphropathie diabétique (97). Or, la bradykinine est un puissant producteur de NO via l'activation de ses deux récepteurs. Bien que nécessitant confirmation, ces résultats suggèrent un rôle protecteur du SKK contre le stress oxydant associé à la néphropathie diabétique.

2.4. Antagonistes des récepteurs de type 1 de l'angiotensine II et SKK

Les antagonistes des récepteurs de type 1 de l'angiotensine II (sartans) constituent l'autre grande classe thérapeutique permettant de bloquer le SRA et utilisés comme les IEC pour réduire la progression de la néphropathie diabétique (68 , 101). Le SKK pourrait également être impliqué dans les effets bénéfiques des antagonistes des récepteurs de type 1 de l'angiotensine II (89). En effet, alors que les IEC inhibent la formation d'angiotensine II et la dégradation de la BK, favorisant ainsi l'activation des récepteurs des kinines, les sartans bloquent l'action de l'angiotensine II sur le récepteur de type 1 l'angiotensine II (AT1). Cette inhibition provoque une augmentation des taux de rénine et une augmentation de la stimulation du récepteur de type 2 de l'angiotensine II (AT2). Or, l'activation du récepteur AT2 par l'angiotensine II induit des effets vasodilatateurs mettant en jeu une signalisation impliquant une synthèse accrue de BK et une activation du B2R (102 , 103). Il semble également que le B2R et le récepteur AT2 soit capable de s'hétérodimériser ce qui entraînerait une augmentation de la production de NO (104). Physiologiquement, il a été montré dans plusieurs modèles que les effets cardiovasculaires des sartans étaient perdus en cas de déficience en TK ou lors de l'inhibition du B2R (105 , 106 , 107). Si ces démonstrations ont montré leur intérêt, l'hypothèse d'un rôle de la BK dans le mécanisme d'action des sartans dans la néphropathie diabétique reste à prouver.

3. SYSTEME KALLICREINE-KININES ET NEUROPATHIE DIABETIQUE

La neuropathie diabétique périphérique est une neuropathie sensitive, caractérisé par une hypoesthésie et/ou des sensations douloureuses inappropriées (paresthésie, hyperesthésie). L'implication du SKK dans la neuropathie périphérique est étayée par de plus en plus de données expérimentales. Le B2R est exprimé dans le système nerveux sensitif et les deux récepteurs sont surexprimés dans différents modèles de neuropathie douloureuse (108). Les données obtenues à partir de modèles expérimentaux suggèrent que lors d'une lésion nerveuse, le B2R est impliqué dans la phase aiguë de la réponse inflammatoire et douloureuse, alors que le B1R participerait à la phase chronique (109, 110). Ces résultats sont concordants avec le mécanisme de régulation cellulaire des récepteurs. Les modèles d'inactivation génétique des récepteurs et leur inhibition pharmacologique ont permis de mettre en évidence une diminution des phénomènes douloureux dans différents modèles de neuropathie notamment diabétique (111 , 112). L'inhibition pharmacologique des récepteurs des kinines pourrait donc être une piste thérapeutique dans le traitement de la neuropathie diabétique.

Cependant, l'étude de l'effet du SKK sur la neuropathie a été essentiellement centrée sur le rôle du B1R dans l'hyperesthésie induite par le diabète (113). Un autre aspect important de la neuropathie diabétique, l'hypoesthésie, qui conduit aux lésions podologiques pourvoyeuses d'amputation, est moins bien étudiée. Kakoki et al. ont montré que la déficience des deux récepteurs aggrave la diminution de la conduction nerveuse induite par le diabète (93), suggérant cette fois un rôle bénéfique du SKK dans la perte de sensibilité secondaire au diabète.

* * *

Les mécanismes à l'origine du diabète et ses complications micro ou macrovasculaires sont multiples. Il semble que le SKK soit en partie impliqué dans la survenue des complications du diabète. Ceci est particulièrement bien démontré pour la néphropathie diabétique même si des études cliniques manquent pour confirmer ce lien. Le rôle respectif de chaque récepteur est en revanche moins clair. Même si le B2R semble avoir un rôle bénéfique dans les complications, l'action du B1R, stimulé lors du diabète, reste à préciser. La meilleure compréhension des mécanismes liant le SKK et le diabète peut permettre de développer de nouvelles approches thérapeutiques, notamment pharmacologiques, pour traiter le diabète et ses complications.

CHAPITRE IV : OBJECTIFS DU TRAVAIL

Ce court chapitre d'introduction aux études de cette thèse a pour but d'introduire, de résumer et d'exposer de façon concise les arguments ayant conduit à ces travaux et les objectifs de ceux-ci.

1. INTRODUCTION

Nous avons vu que le SKK était impliqué dans l'ensemble des complications du diabète. Nous verrons également en détail dans le chapitre suivant que le SKK est impliqué dans le développement des anomalies métaboliques conduisant au diabète de type 2. Il existe en effet des arguments cliniques indirects d'un effet du SKK dans la survenue du diabète de type 2. Les évidences cliniques proviennent de l'utilisation des IEC dans les grands essais contrôlés randomisés dont des analyses secondaires ont montré une tendance à la diminution des cas de nouveau diabète chez les sujets sous IEC par rapport au groupe contrôle (Abuissa 2005). Cependant, ces résultats ne sont pas confirmés par une étude spécifiquement construite pour étudier l'effet du ramipril, un IEC, sur la survenue de diabète dans une population à risque (DREAM, NEJM, 2006). On a vu que l'effet des IEC était, en partie du moins, lié à l'activation du SKK et une hypothèse est donc de penser que l'effet bénéfique possible des IEC sur la survenue de diabète soit lié à l'action du SKK. Cette hypothèse d'un effet du SKK dans l'homéostasie glucidique est soutenue par plusieurs études expérimentales. Celles-ci mettent en évidence un effet du SKK à la fois sur l'insulinosensibilité mais également sur l'insulinosécrétion. L'action globale du SKK semble être bénéfique mais l'étude du rôle respectif de chaque récepteur montre un effet contradictoire du B1R et du B2R. En effet, le B2R semble avoir un effet bénéfique sur le développement des anomalies glucidiques et

métaboliques liées au diabète de type 2. Au contraire, l'effet du B1R semble lui délétère notamment par des mécanismes proinflammatoires. Une limite cependant à ces résultats est le fait qu'ils sont obtenues le plus souvent à partir de modèle d'inactivation génétique d'un récepteur. Or l'inactivation d'un récepteur entraîne la surexpression compensatrice de l'autre récepteur. Il est donc difficile de faire la part des choses entre l'effet de la délétion génique et l'effet de la surexpression contre-régulatrice dans les anomalies observées chez ces modèles expérimentaux.

2. OBJECTIFS

La première partie de cette thèse a pour objectif de mieux comprendre le rôle du SKK dans la survenue des anomalies glucidiques du diabète de type 2. Nous étudierons pour cela le rôle de l'inactivation totale ou partielle de la TK afin de s'affranchir de l'effet contre-régulateur de chaque récepteur. Nous étudierons à la fois un modèle expérimental d'inactivation génétique de la TK chez la souris et l'effet d'un polymorphisme fonctionnel de la TK lié au niveau d'activité de la TK, chez l'homme.

La deuxième partie s'attachera à étudier l'effet de la stimulation du SKK dans les lésions d'ischémie-reperfusion cardiaque lors du diabète. Nous avons vu que le SKK semble avoir un rôle protecteur dans les complications cardiaques et rénales du diabète. Nous verrons en détail dans la deuxième partie que le SKK est également très impliqué dans les mécanismes cardioprotecteurs de l'ischémie-reperfusion myocardique. Ces effets bénéfiques pourraient être mis à profit pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques contre les lésions d'ischémie-reperfusion. Nous utiliserons ainsi des agonistes spécifiques de chaque récepteur, récemment développés, pour étudier le rôle de chaque récepteur dans un modèle d'ischémie-reperfusion cardiaque chez le souris diabétique et non diabétique. Ces résultats pouvant ouvrir la voie au développement préclinique de nouveau traitement du syndrome coronarien aigu.

CHAPITRE V : ROLE DU SYSTEME KALLICREINE-KININE DANS LE METABOLISME GLUCIDIQUE

1. INTRODUCTION

La physiopathologie du diabète et notamment du DT2 est un phénomène complexe faisant intervenir un grand nombre d'acteurs. Les anomalies du métabolisme glucidique du DT2 se développent progressivement sous la pression de facteurs environnementaux et de facteurs génétiques de susceptibilité. Parmi l'ensemble des anomalies physiologiques participant au développement des altérations de l'homéostasie glucidique, il semblerait que le SKK joue un rôle. En effet, il existe des arguments cliniques et expérimentaux mettant en évidence une relation entre le SKK et le développement des anomalies glucidiques conduisant au DT2.

Les arguments cliniques reposent essentiellement sur les effets de l'inhibition de l'ECA ou sur les variations de polymorphisme du gène de l'ECA sur l'incidence du DT2 ou la sensibilité à l'insuline. Les premières études cliniques réalisées sur un petit nombre de sujets ont ainsi mis en évidence un effet bénéfique des IEC sur la sensibilité à l'insuline (114 , 115). Les grandes études thérapeutiques testant l'effet des IEC ont ensuite mis en évidence une diminution de l'incidence du DT2 chez les sujets traités par rapport aux contrôles. Ainsi, l'étude HOPE, étudiant l'effet du Ramipril sur la morbi-mortalité cardiovasculaire, a montré qu'il existait une diminution du risque relatif d'apparition de nouveau cas de diabète de 31% après 7 ans de traitement (116). De même une méta-analyse sur la prévention du diabète par les IEC, regroupant les principales grandes études thérapeutiques publiées, a montré une diminution du risque relatif de 27% de l'incidence du DT2 (117). Cependant la plupart des

résultats sur les paramètres métaboliques de ces grandes études d'intervention sont issus d'analyses secondaires post-hoc et portent sur des critères de jugement pas toujours définis en début d'études. L'étude DREAM a en revanche spécifiquement étudiée l'effet du Ramipril contre placebo chez 5 269 individus sans pathologie cardiovasculaire mais présentant une hyperglycémie à jeun (glycémie à jeun entre 1,10 et 1,26 g/l) ou une intolérance au glucose (glycémie entre 1,40 et 2,00 g/l, 2 heures après une charge en glucose). Le critère principal de jugement de cette étude dont le suivi médian était de 3 ans, était l'incidence des nouveaux cas de diabète et les décès. Les autres critères secondaires incluaient notamment la glycémie à jeun et la régression des anomalies glucidiques. Les résultats sur le critère principal étaient négatifs. Ainsi un diabète est apparu chez 449 participants dans le groupe Ramipril (17,1%) contre 489 dans le groupe placebo (18,5%) (Hazard ratio 0.91 ; 95% CI, 0.80-1.03). La glycémie à jeun à la fin de l'étude était identique dans les deux groupes mais la glycémie deux heures après HGPO était plus basse et le nombre d'individus dont la glycémie s'était normalisée était significativement plus élevé dans le groupe Ramipril (118). Le même type d'étude a été réalisé chez 9306 patients mais cette fois avec un antagoniste du récepteur de type 1 de l'angiotensine II (sartans) dont les liens possibles avec l'activation du SKK ont été détaillés dans l'introduction. Les résultats sont positifs sur le critère primaire avec une réduction significative de 14% du risque de diabète après 5 ans de suivi.

Par ailleurs, il a été montré que le polymorphisme Insertion/Délétion du gène de l'ECA, qui détermine le niveau d'activité de l'ECA, modulait la sensibilité à l'insuline. Ainsi, Bonnet et al. ont étudié le rôle de ce polymorphisme dans la sensibilité à l'insuline chez 1286 sujets sains par des mesures de clamp euglycémique hyperinsulinémique. Les résultats montrent que le polymorphisme D, qui est associé à un taux élevé d'ECA, est associé à une diminution de l'insulinosensibilité (119).

L'effet de l'ECA sur l'incidence du DT2 peut évidemment être lié à son action sur le SRA (120), mais il est envisageable que le SKK joue un rôle dans ce phénomène protecteur au niveau métabolique. Cette hypothèse a d'ailleurs été soutenue par des études expérimentales qui ont montré que l'utilisation d'un antagoniste spécifique du récepteur B2 des kinines abolissait l'amélioration de la sensibilité à l'insuline obtenue par IEC chez le rongeur (121, 122). Cependant, les arguments cliniques en faveur de ce lien sont limités, mais quelques données issues de l'étude des polymorphismes du B2R sont disponibles. L'étude du polymorphisme (T38C) du B2R a montré des résultats contradictoires mais dans des populations différentes (123). Alvim et al. ont montré qu'un autre polymorphisme (-9/+9) du B2R était associé à un risque accru de diabète dans une étude transversale d'une population générale (124). Cependant ces résultats restent limités et on a mentionné précédemment que la modulation d'expression d'un des récepteurs était souvent associé à une compensation régulatrice de l'autre récepteur (ici B1R), pouvant rendre compte des effets observés.

Les preuves expérimentales de l'effet du SKK sur l'action et la sécrétion de l'insuline sont plus étayées. Ainsi, dans un modèle de souris transgéniques déficientes pour le B2R, il est observé le développement d'une insulino-résistance, avec une glycémie identique mais un taux d'insuline plus élevé que chez la souris sauvage (93, 125). A l'inverse, l'étude de souris transgéniques déficientes pour le B1R montre à la fois une augmentation de l'insulinosensibilité et une réduction de l'insulinosécrétion, probablement en rapport avec des anomalies morphologiques insulaires (126). L'effet de chaque récepteur sur le métabolisme glucidique semble donc être opposé. Il est à noter que la double délétion B1R et B2R améliore les paramètres glucidiques dans un modèle d'obésité (127).

Les hypothèses et les arguments expérimentaux expliquant l'effet bénéfique du SKK sur le métabolisme du glucose impliquent les deux composantes de la pathogenèse du DT2 : l'insulinosécrétion et l'insulinosensibilité.

Concernant l'insulinosécrétion, Yang et al. ont montré sur des pancréas isolés perfusés de rat que l'injection de BK augmentait la sécrétion d'insuline de façon dose-dépendante et qu'un antagoniste du B2R diminuait la sécrétion basale d'insuline et abolissait l'augmentation induite par l'injection de BK (128). Cependant dans l'étude de Damas et al, l'injection de BK à des rats anesthésiés ne montre pas d'effet sur les taux d'insuline plasmatique (129).

L'action bénéfique de la BK sur l'insulinosensibilité pourrait être liée à son action vasodilatatrice au niveau artériel. En effet, il a été montré que la perfusion musculaire joue un rôle important dans la capacité de la cellule musculaire à capter le glucose plasmatique (130). Ainsi l'injection d'un antagoniste de la BK durant un clamp euglycémique hyperinsulinémique chez des rats améliore la captation de glucose et l'insulinosensibilité (131). Cette observation chez l'animal a été validée chez l'homme : Frossard et al. ont en effet montré que l'injection de BK ou d'inhibiteur de l'ECA lors d'un clamp diminuait le gradient de concentration de glucose artère/interstitium (132). Ainsi la BK permettrait une augmentation de la perfusion musculaire et donc une amélioration de la captation de glucose.

L'effet de la BK sur l'insulinosensibilité n'est pas uniquement lié à son effet vasodilatateur mais pourrait également être lié à un effet plus direct. En effet, des arguments expérimentaux mettent en évidence une action de la BK sur la voie de signalisation de l'insuline par une action sur ses différents effecteurs. La BK augmente la translocation du transporteur de glucose GLUT4 à la membrane (133). Beard et al. ont montré que la BK améliorait la captation de glucose au niveau des adipocytes de rat de façon NO dépendante et que cet effet était lié à l'augmentation par la BK du taux de phosphorylation de Akt et des

tyrosines d'IRS-1. De plus cet effet s'accompagne d'une diminution de l'activation de JNK et de la phosphorylation des sérines d'IRS-1 (134). De même, l'injection d'un plasmide exprimant la BK chez des rats diabétiques permet d'atténuer la baisse d'expression de PI3K, d'Akt, et d'AMPK secondaire à l'induction du diabète, et donc une diminution de l'insulinémie traduisant une diminution de l'insulinorésistance (135).

L'ensemble de ces données est donc en faveur d'un rôle du SKK dans la pathogénèse de DT2 et notamment de l'insulinorésistance. Cependant les résultats cliniques restent limités à l'observation de l'effet des IEC. De plus, la plupart des modèles génétiques utilisés sont des modèles génétiques d'inactivation de récepteur. Or, la suppression d'un récepteur entraîne une surexpression compensatrice de l'autre récepteur et rend l'interprétation des effets du récepteur manquant dépendante de l'action de l'autre récepteur.

En conclusion, même s'il existe des arguments en faveur d'un rôle bénéfique du SKK sur le métabolisme glucidique, notamment via ses deux récepteurs, le rôle de la TK dans le métabolisme glucidique reste à déterminer. **Le but de nos travaux est donc d'étudier le rôle de la TK, enzyme clé de la formation des kinines, dans le développement des anomalies métaboliques liées au diabète de type 2 et à l'obésité**, par différentes approches. Nous avons utilisé pour cela un modèle génétique de souris déficiente en TK (TK^{-/-}), développé dans le laboratoire (136) et l'avons combiné à deux modèles d'obésité et d'insulinorésistance; un modèle d'obésité induite par régime gras et un modèle génétique d'obésité, les souris ob/ob déficiente en leptine. Ces études expérimentales ont été complétées par une étude de génétique humaine: l'effet d'un polymorphisme de la TK, modulant l'expression des kinines, dans une importante cohorte humaine suivie pendant 9 ans.

Les souris TK^{-/-} ont été générées au sein du laboratoire par le Dr P. Meneton et coll. (136) grâce à la technique de transgénèse ciblée par recombinaison homologue. Le vecteur de recombinaison a été construit de manière à remplacer, par recombinaison homologue, la partie comprise entre les sites SacI et BsgI dans le gène *mGK-6* codant pour la TK (exon 4) par un gène de résistance à la néomycine et ainsi invalider ce gène. Cette région est une des rares qui ne soit pas fortement conservée dans la famille génique murine des kallicréines tissulaires. Sur l'allèle recombiné, l'exon 4 est ainsi interrompu par le gène de résistance à la néomycine entraînant ainsi une inactivation du gène de la TK. Il a été montré que la déficience en TK de ces souris était associée à une absence de production de kinines (136).

2. ARTICLE: TISSUE KALLIKREIN DEFICIENCY, INSULIN RESISTANCE AND DIABETES IN MOUSE AND MAN

Tissue kallikrein deficiency, insulin resistance and diabetes in mouse and man

Louis Potier^{1,2,3,4,6}, Ludovic Waeckel^{1,2,3}, Frédéric Fumeron^{5,6}, Sophie Bodin^{1,2,3}, Marinos Fysekidis^{5,6}, Catherine Chollet^{1,2,3}, Naima Bellili^{5,6}, Fabrice Bonnet⁷, Gaëlle Gusto⁸, Gilberto Velho^{5,6}, Michel Marre^{4,5,6}, François Alhenc-Gelas^{1,2,3}, Ronan Roussel^{1,2,3,4,5,6}, Nadine Bouby^{1,2,3} and the DESIR study group

Authors affiliations:

1INSERM U872, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France

2University Paris Descartes, Paris, France

3University Pierre & Marie Curie, Paris, France

4Diabetology, Endocrinology and Nutrition Department, AP-HP, Bichat-Claude Bernard Hospital, Paris, France

5INSERM U695, Paris, France

6Paris Diderot University, Paris 7, Paris, France

7Department of Endocrinology, CHU Rennes, Univ Rennes 1, Inserm UMR 991, Rennes, France

8Institut inter Régional Pour la Santé, Irsa, La Riche, France

RR and NB were equally senior co-authors of this paper

Corresponding author:

Nadine BOUBY

Address: INSERM U 872, Centre de Recherches des Cordeliers, 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006 PARIS, FRANCE

Tel: 33 (0)1 44 07 90 36

Fax: 33 (0)1 44 27 64 21

E-mail: nadine.bouby@crc.jussieu.fr

Short title: Tissue kallikrein and glucose metabolism

Keywords: tissue kallikrein, kinins, diabetes, polymorphism, glucose metabolism, mice, human

Word count: 3268

ABSTRACT

Bradykinin signaling has been suggested to have either protective or deleterious effects in disorders of glucose metabolism. The role of the kallikrein-kinin system in insulin resistance and diabetes is debated. We have evaluated the consequence of deficiency in tissue kallikrein (TK), the main kinin-forming enzyme, on development of insulin resistance and diabetes in mouse and man.

Mice with inactivation of the tissue kallikrein gene were fed high-fat diet for 3 months, or crossed with obese, leptin deficient (ob/ob) mice to generate double ob/ob-TK deficient mutants. In man, a loss-of-function polymorphism of the tissue kallikrein gene (R53H) was studied in a large general population cohort tested for insulin resistance, the D.E.S.I.R study (4,843 participants, 9 year follow-up).

Mice deficient in tissue kallikrein gained less weight on high-fat diet than wild-type littermates. Fasting glucose level was increased and responses to glucose (GTT) and insulin (ITT) tolerance tests were altered at 10 and 16 weeks of high-fat diet compared to standard diet but tissue kallikrein deficiency had no influence on these parameters. Likewise, ob-TK^{-/-} mice had similar GTT and ITT responses compared to ob-TK^{+/+} mice. Tissue kallikrein deficiency had no effect on blood pressure in both models. In humans, changes over time in body mass index, fasting plasma glucose, insulinemia, and blood pressure were not influenced by the defective 53H-coding tissue kallikrein allele. Incidence of diabetes was not influenced by this allele.

These data do not support a role for tissue kallikrein-kinin system, protective or deleterious, in development of insulin resistance and diabetes.

INTRODUCTION

Prevalence of obesity is increasing worldwide, together with the metabolic and cardiovascular complications of the condition, related in part to insulin resistance (Ogden, et al. 2012). Intervention trials aimed at preventing obesity-related disorders have provided encouraging, but still limited results (Laatikainen, et al. 2007; Satterfield, et al. 2003). The pathogenesis of insulin resistance and diabetes in obesity is complex and still incompletely understood. Besides nutritional and metabolic factors, hemodynamic alterations and vascular dysfunction are believed to play a role (Mather, et al. 2013). Vasomotor peptide systems, especially the renin angiotensin and kallikrein-kinin systems, have been suggested to be involved in development of insulin resistance (Mayfield, et al. 1996; Sarzani, et al. 2008), a hypothesis that has been recently supported by results of clinical trials.

Clinical trials have indeed suggested that angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors and several angiotensin II AT1 receptor antagonists improve insulin sensitivity and prevent type 2 diabetes in high risk patients, albeit this effect has not been observed in all studies (Abuissa, et al. 2005; Bosch, et al. 2006). ACE (kininase II) converts angiotensin I into angiotensin II and is also a major kinin-degrading enzyme. There is consistent experimental evidence suggesting that the cardiovascular and renal effects of ACE inhibitors, including in diabetes, are due in large part to kinins (Buleon, et al. 2008; Griol-Charhbil, et al. 2005; Liu, et al. 2000). Similarly angiotensin II AT1 receptor blockade induces renin secretion and AT2 receptor activation which triggers tissue kallikrein (TK) mediated kinin release and kinin receptor activation. Cardiac, vascular and renal effects of AT1 receptor blockers, like those of ACE inhibitors, are suppressed experimentally by pharmacological or genetic inactivation of TK, the main kinin forming enzyme, or kinin receptors. Thus, a prominent role for TK and kinins in these effects is suggested (Bergaya, et al. 2004; Messadi-Laribi, et al. 2007). The question therefore arises as to whether the kallikrein kinin system (KKS) is involved in the

beneficial effect on glucose metabolism of ACE inhibition and AT1 receptor blockade observed in clinical trials. This hypothesis is further supported by experimental studies documenting kinins mediated improvement of insulin resistance during ACE inhibitor treatment in obese and diabetic rodents models (Henriksen, et al. 1999; Shiuchi, et al. 2002). TK gene therapy has been reported to reverse insulin resistance and attenuate nephropathy in diabetic rats (Yuan, et al. 2007). Moreover, lack of kininogen or kinin B2 receptor impaired insulin sensitivity and glucose tolerance in non diabetic animals suggesting that the KKS is involved in insulin action and glucose homeostasis (Damas, et al. 1999; Duka, et al. 2001; Kakoki, et al. 2010).

The KKS may enhance glucose metabolism through endothelium activation, vasodilation, increase in blood flow and delivery of energy substrates and hormones to tissues and by facilitating transcapillary glucose transport (Baron, et al. 1994; Frossard, et al. 2000). Bradykinin also increases glucose uptake in muscular cells and primary adipocytes by triggering GLUT4 translocation through insulin dependent and independent pathways (Beard, et al. 2006; Isami, et al. 1996; Kishi, et al. 1998; Rett, et al. 1996). However, in humans, the effect of kinins on muscle glucose uptake remains controversial (Dietze, et al. 1996; Mahajan, et al. 2004; Nuutila, et al. 1996).

While clinical and experimental studies have suggested that the KKS protects against development of insulin resistance, the hypothesis remains insufficiently documented, especially outside the setting of ACE inhibition. Study of the role of KKS in diseases has been hampered by lack of suitable pharmacological inhibitors of TK. Recently murine and human genetic “models” of TK deficiency became available. The TK gene has been inactivated in the mouse resulting in suppression of kinin formation (Meneton, et al. 2001). In man, a major loss of function polymorphism of the TK gene resulting in an inactivating mutation of the enzyme (R53H) has been described (Azizi, et al. 2005; Slim, et al. 2002). We

evaluated the consequences on insulin sensitivity and glucose metabolism of lack of TK in mice with dietary (high fat diet) or genetically (leptin mutation, ob/ob trait) induced obesity and insulin resistance. We investigated the impact of the R53H defective variant of TK on metabolic status and incidence of insulin resistance and diabetes in a large population-based cohort.

MATERIAL AND METHODS

Animal studies

High fat diet model

TK deficient mice (Meneton et al. 2001) of 129/Sv-C57/BL6 genetic background and wild type (TK^{+/+}) littermates received a standard chow diet (SD) or a high-fat diet (HFD) for 19-weeks starting at 5 weeks of age. Four groups of mice, SD-TK^{+/+} (n=7), HFD-TK^{+/+} (n=12), SD-TK^{-/-} (n=16), and HFD-TK^{-/-} (n=13) were studied. Standard diet contained 13.6% of calories from fat, 25.3% from protein, and 61.1% from carbohydrates (A03, SAFE, Augy, France). High-fat diet contained 46.0% of calories from fat, 15.5% from protein, and 38.5% from carbohydrates (HF 235, SAFE, Augy, France).

Genetic ob/ob model

Experiments were carried out in double mutant mice with deficiency in both TK and leptin genes on C57BL6 background. These mice were generated by breeding homozygous TK^{-/-} mice with heterozygous obese C57BL/6J lepob (+/-) (Charles River Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). The double heterozygous mutants of the F1 generation were then intercrossed for 4 generations. Double homozygous mutants ob-TK^{-/-} (n=7) were compared to ob-TK^{+/+} (n=8) littermates.

All experiments were conducted in accordance with the European regulations for the care and use of laboratory animals (L 358-86/609/EEC) and were approved by the local ethic committee (Charles Darwin ethics committee for animal experimentation). All efforts were made to minimize animal suffering. Sacrifice was made by cervical dislocation. The mice were housed with a 12 h light/dark cycle, and had free access to drinking water.

Metabolic studies

Body weight was measured every 2 weeks. Glucose (GTT) and insulin (ITT) tolerance tests were performed at 10 and 16 weeks after feeding initiation in HFD protocol and at 13 and 19 weeks of age in ob/ob protocol. GTT was performed by intraperitoneal injection of 1 g glucose/kg body weight after 5h of fasting. ITT was performed by injection of 0.5 (HFD protocol) or 1 unit (ob/ob protocol) insulin/kg body weight. Blood samples were collected from the tail at $t = 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90$ and 120 min. Glucose concentration was measured using diagnostic glucometer from Lifescan Laboratories (Issy les Moulineaux, France). Insulin concentration was measured at $t=0, 15, 30, 60, 120$ min by enzyme-linked immunosorbent assay using mouse insulin as standards (MILLIPORE, Molsheim, France).

Body composition was measured in live animals by dual-energy X-ray absorptiometry (Piximus apparatus Lunar, Madison, WI) in high fat fed mice only. Animals were sacrificed at 24 and 22 weeks of age for HFD and ob/ob model respectively and inguinal and mesenteric fat was collected and weighted.

Blood pressure measurements

Systolic blood pressure and heart rate were monitored in conscious but restraint mice by tail-cuff plethysmography (BP2000, Visitech System, Bioseb, Vitrolles, France) 18 weeks after initiation of feeding in HFD protocol and at 20 weeks of age in ob/ob protocol. After two days of adaptation, measurements were done for three consecutive days, between 10:00-12:00am.

Fifteen consecutive measurements were averaged for each mouse on each day and the mean of the three daily values was calculated.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM. Statistical analyses were performed using ANOVA followed, when appropriate, by the Fisher protected least significant difference (PLSD) post hoc test for HFD protocol. Student's t-test was used for ob/ob protocol. Significance was set at $p < 0.05$.

Human study

The Data from Epidemiological Study on the Insulin Resistance syndrome (D.E.S.I.R.) study is a 9-year prospective study conducted in 5,212 men and women from the French general population (Balkau, et al. 2008). Participants were recruited in ten healthcare centres in the western central part of France on the occasion of periodic health check-ups offered by Social Security. The research protocol was approved by the ethics committee of Bicêtre Hospital and all participants signed an informed consent form. The study protocol included clinical and biological evaluations at inclusion and at visits at 3, 6 and 9 years of follow-up. Type 2 diabetes was defined as fasting plasma glucose (FPG) ≥ 7.0 mmol/l or as FPG < 7.0 mmol/l in presence of treatment with anti-diabetes drug. Participants with diabetes at baseline (n=134, 2.6%) were excluded from the analyses. Incident cases type 2 diabetes were defined as subjects free of disease at entry who developed the disease at any time during the follow-up. The glycemic status of participants (n=102, 2.0%) could not be ascertained at baseline and these patients were excluded from the analyses. Individuals without diabetes at baseline lost during follow-up and those for whom final glycemic status could not be determined (n=1148, 22.0%) were excluded from analysis of incidence. Weight and height were measured by

trained personnel. Venous blood samples were collected in the morning after subjects had fasted for 12h. Systolic and diastolic blood pressures were measured with a mercury sphygmomanometer adapted for arm size after 5 min of rest in supine position. Results of two consecutive measurements were averaged, for analysis. A detailed description of laboratory measurements including glucose and insulin is provided elsewhere (Balkau et al. 2008). Homeostasis Model Assessment index of insulin sensitivity (HOMA-IR), based on fasting levels of glucose and insulin, was computed using the Microsoft Excel spreadsheet implementation of the HOMA Calculator (v2.2) available at www.dtu.ox.ac.uk/Homacalculator/download.php (accessed 1 March 2006). Creatinine clearance was calculated according to the Modification of Diet in Renal Disease formula (Levey, et al. 1999).

R53H genotyping

The G230A (rs5515 coding for R53H) SNP of the Tissue Kallikrein gene, hKLK1, located on chromosome 19 (19q13.2-q13.4) was genotyped using the Assay by Design kit from Applied Biosystems (Life Technologies SAS, Saint Aubin, France) (Slim et al. 2002). The conditions for TaqMan reaction were as follows: 50°C for 2 min, 95°C for 15 min, and 45 cycles of 90°C for 15 s and 60°C for 1 min.

Statistical analysis

Comparison was made between genotype RR (R53 homozygotes) versus H allele carriers (genotypes RH+HH, R53H heterozygotes and H53 homozygotes) because of the rare frequency of homozygous HH subjects (n=6). Baseline characteristics were compared among genotypes using Chi-2 test for categorical variables, and ANCOVA for continuous variables including sex and age as covariables. Genotype associations with incidence of diabetes during follow-up were assessed by logistic regression models. ANCOVA for repeated measurements

was used to compare evolution of clinical and biological variables at 0, 3, 6 and 9 years of follow-up. Skewed variables (insulinemia, HOMA-IR) were log-transformed before statistical analyses. All analyses were adjusted on sex, age, body mass index (BMI) and FPG at baseline. Results are expressed as means \pm SD. $P < 0.05$ was considered significant. Statistics were performed with Statview (SAS Institute, Cary, NC, USA).

RESULTS

Animal Studies

High fat diet-fed model

As expected, HFD animals were significantly heavier and had larger weight increases than SD animals (Fig. 1a,b). No difference in body weight was observed between TK^{+/+} and TK^{-/-} mice under SD, but after 19 weeks of HFD, TK^{-/-} mice had gained 20% less weight ($p < 0.05$) and tended to have lower fat mass ($p = 0.06$) than TK^{+/+} (Fig. 1c).

Fasting glucose level and area under the curve (AUC) of glucose during GTT were significantly higher in HFD mice than SD mice at 10 and 16 weeks in both genotypes. No effect of genotype was observed in HFD and SD groups (Fig. 2a-d). In HFD mice, insulin release was significantly increased during GTT compared with SD mice but there was no genotype effect (Fig. 2e,d). Similarly, glucose response during ITT at 10 and 16 week was higher in HFD than SD group but no effect of genotype was observed (Fig. 3).

Diet and genotype had no significant effect on blood pressure. Heart rate was significantly increased in HFD mice compared to SD mice, in both TK^{-/-} and in TK^{+/+} mice ($p < 0.05$, Table 1).

Genetic ob/ob model

Body weight and weight gain were similar in ob-TK^{+/+} and ob-TK^{-/-} mice (Fig. 4). There was no difference between ob-TK^{+/+} and ob-TK^{-/-} for fasting glucose and AUC of glucose (Fig. 5), as well as for insulin during GTT (not shown). Glucose response during ITT was similar in both groups (Fig. 6). No difference was seen between ob-TK^{+/+} and ob-TK^{-/-} mice in inguinal and mesenteric fat mass (Online resource 1). There was no effect of TK deficiency on systolic blood pressure (107±5 vs 115±3 mm Hg in ob-TK^{-/-} vs ob-TK^{+/+} mice respectively) and heart rate (539±76 vs 575±21 bpm in ob-TK^{-/-} vs ob-TK^{+/+} mice respectively).

Human studies

Baseline characteristics

Genotypes were available for 4950 of the 5110 participants with known diabetic status at baseline (genotyping failure rate 3.1%). Among these 4950 individuals, 132 had diabetes at baseline. Proportion of RR and RH+HH genotypes did not differ significantly according to diabetes at baseline (RR: 122 (2.6%) and 4465 (97.4%) in people with and without diabetes respectively, RH+HH: 10 (2.7%) and 353 (97.3%) in people with and without diabetes respectively, $p=0.91$).

Table 2 summarizes the demographic features and clinical and metabolic profiles at baseline of the population without diabetes at baseline, according to R53H genotypes. Rare variant (H53-coding) allelic frequency was 3.93% and 3.60%, in men and women respectively ($p=0.49$). Genotype distributions were in Hardy-Weinberg equilibrium. Six subjects were homozygotes for the H53 variant while 346 were heterozygotes. There was no significant

53H-coding allele association with weight, BMI, markers of abdominal obesity, fasting plasma glucose, fasting insulinemia, HOMA-IR, and blood pressure.

Follow-up study

Changes in BMI, FPG, fasting insulinemia, systolic blood pressure and heart rate over time did not differ according to TK genotype (Table 3). Among the 4818 people with genotype, without diabetes at baseline a total of 193 subjects developed diabetes, with no association with R53H genotype: 180 had the RR genotype (4.0% of all the RR genotype carriers), and 13 had the RH or HH genotypes (3.7%), $p=0.76$.

DISCUSSION

The present data show that TK haploinsufficiency in middle-aged humans and TK deficiency in mice with dietary- or genetically-induced obesity do not significantly influence development of insulin resistance and associated metabolic and hemodynamic abnormalities.

Animal Studies

Obesity is a hallmark of the HFD and ob/ob mice models (Tschop and Heiman 2002). Our data indicate that TK deficiency altered weight gain in HFD but not in ob/ob. Similar results were observed in a mouse model of kinin B1 receptor deficiency (Mori, et al. 2008). Resistance to obesity in B1 receptor deficient animals was suggested to be due to increased leptin sensitivity and therefore absent in mice lacking leptin (Mori et al. 2008). Our data in TK deficient mice are consistent with this hypothesis.

In the present study, absence of TK and TK-derived kinins did not alter glucose tolerance, insulin sensitivity and insulin release assessed by GTT or ITT responses, in two models of obesity and insulin resistance. These negative observations may not be inconsistent with previous studies documenting effects of kinins B1 and B2 receptors on insulin secretion or action. Indeed, these studies suggest that kinin receptors may exhibit isoform-specific differences in modulating metabolic processes. Mice lacking B1 receptor, fed standard diet, presented pancreas abnormalities, characterized by fewer pancreatic islets and lower insulin content, associated with hypoinsulinemia and reduced insulin secretion after glucose load (Araujo, et al. 2006). Mori et al. have suggested facilitation of insulin action in adipocytes by the B1 receptor, leading to fat accumulation and insulin resistance in response to HFD (Mori, et al. 2012). The deleterious effect of B1 receptor in pancreas and adipocytes may be mediated by the role of this receptor in inflammation (Catanzaro, et al. 2010), a process involved in pathogenesis of type 2 diabetes. Pharmacological blockade of B1 receptor decreased inflammatory markers of obesity and reversed metabolic abnormalities and insulin resistance by reducing oxidative stress in glucose-fed rats (Dias and Couture 2012). On the opposite, B2 receptor activation may have beneficial effects on glucose metabolism. Lack of B2 receptor in mice impaired insulin-dependent glucose transport (Duka et al. 2001) and increased hepatic glucose production (Barros, et al. 2012a) leading to a state of insulin resistance. In rats, a B2 receptor antagonist reduced glucose uptake and insulin sensitivity (Kohlman, et al. 1995). Loss of both B1 and B2 receptors signaling in TK deficient mice may result in a null phenotype on glucose metabolism.

On the other hand, while TK is the main source of kinins in healthy mice (Meneton et al. 2001) other kinin forming enzyme might be activated in the setting of obesity and become principal source of kinins, while this remains speculative. Plasma prekallikrein (or kallikrein B), a potential kinin forming enzyme present in inactive form in healthy mice was found to be

activated in insulinopenic diabetic rats (Rothschild, et al. 1999; Tschöpe, et al. 1999), but no data are available concerning obesity and insulin resistance.

Mice deficient in both B1 and B2 receptor display mild hyperinsulinemia with normal glucose level suggesting mild insulin resistance (Kakoki et al. 2010). In ob/ob mice made deficient in both kinin receptors mild hyperglycemia, enhanced insulin release and hepatic abnormalities have been reported (Barros, et al. 2012b). The discrepancy between the TK and the B1/B2 receptor deficient mice may be related to use of different experimental conditions especially gender, and duration of the study. Indeed in the Barros et al study, difference in glucose tolerance between wild type and mice lacking B1 and B2 receptors was observed only in 6 month-old female mice and not in younger animals. Nevertheless, we did not observe any difference in glucose parameters between ob-TK^{+/+} and ob-TK^{-/-} when we performed GTT and ITT in 12 month old mice (Online resource 2). Difference between TK and B1/B2 receptors deficient mice may also be explained by the role of putative non-TK kinin-forming enzymes, as discussed above.

Although obesity and insulin resistance are associated in man with hypertension, we observed no difference in blood pressure between C57Bl6 mice fed either HFD or SD diet. This is in agreement with previous observations made in this model (Belin de Chantemele, et al. 2011; Williams, et al. 2003). The increase in heart rate in HFD mice is probably due to leptin-mediated sympatho-activation (Belin de Chantemele et al. 2011). Indeed, no difference in heart rate was observed between TK^{+/+} and ob/ob mice. TK deficiency had no effect on blood pressure in HFD or in ob/ob mice, suggesting that TK does not play any antihypertensive role in these models, contrary to other pro-hypertensive mice models related to sodium retention (Waeckel, et al. 2012).

Human study

Relevance of our experimental findings to human pathophysiology was assessed by investigating the impact of a loss-of-function polymorphism of the TK gene (R53H) on incidence of insulin resistance and diabetes in a general population cohort. The DESIR study is a large-cohort study with 9 years follow-up aimed at identifying genetic and non-genetic determinants of insulin resistance and type 2 diabetes (Balkau et al. 2008). The G to A transition mutation in exon 3 of the TK gene results in His to Arg substitution at position 53 in the amino-acid sequence of TK and which reduces dramatically (>90%) the kinin forming activity of the enzyme (Slim et al. 2002). We show that the defective 53H variant of TK did not affect incidence of insulin resistance and diabetes in the DESIR cohort.

Few human studies have been conducted to date on KKS and risk of metabolic diseases. A common variant of the ACE (kininase II), gene associated with high ACE level and presumably reduced kinins concentration has been linked to the risk of insulin resistance in a large cohort but angiotensin may be also involved in this effect (Bonnet, et al. 2008). Promoter variations in the B2 receptor gene have been linked to risk of insulin resistance or diabetes in smaller populations (AlvimRde, et al. 2012; Fallo, et al. 2004). However, the functionality of these genetic variants was not documented. The present study suggests that TK, despite its genetic variability, is not involved in genetic susceptibility to insulin resistance and diabetes. These human data are consistent with the mouse data.

A limitation of the human study is the low number of homozygote subjects, due to allelic frequency (0.03) of the defective variant. While 6 to 7% of subjects in white populations are heterozygote, homozygote subjects are very rare (0.05%)(Slim et al. 2002). Accordingly mainly heterozygote subject only partially deficient in TK were studied. However,

heterozygote subjects have reduced urinary kallikrein activity and an arterial phenotype (Azizi et al. 2005).

In conclusion, we have shown that genetic deficiency in tissue kallikrein activity has no influence on development of insulin resistance and diabetes in mouse and man. Our results do not exclude an effect of kinin receptors, suggested by previous studies. It seems that B1R and B2R have opposite effect on glucose homeostasis. Therefore, absence of stimulation of both in TK deficiency could lead to the neutral effect observed in our study. The present data also does not exclude an effect of kinins in situations where kinin levels increase as a consequence of impaired catabolism, like ACE inhibition.

Declaration of interest

LP, LW, FAG, RR and NB hereby declare a duality of interest in view of the patent submitting for the use of peptide kinin B1 and B2 receptor agonists in the prevention or treatment of ischemia related organ damage (No EP12305349). FF, SB, MF, CC, NB, FB, GG, GV, MM declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This work was supported by the Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, the Universities Paris-Descartes, Pierre and Marie Curie and Paris Diderot, and grants from the Association Française des Diabétiques and the Fondation pour la Recherche Médicale.

Acknowledgements

The authors are grateful to Georges Zadigue (INSERM U872, Paris) for his contribution to some parts of this study.

References

Abuissa H, Jones PG, Marso SP & O'Keefe JH, Jr. 2005 Angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers for prevention of type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Am CollCardiol* 46 821-826.

AlvimRde O, Santos PC, Nascimento RM, Coelho GL, Mill JG, Krieger JE & Pereira AC 2012 BDKRB2 +9/-9 Polymorphism Is Associated with Higher Risk for Diabetes Mellitus in the Brazilian General Population. *Exp Diabetes Res* 2012 480251.

Araujo RC, Mori MA, Merino VF, Bascands JL, Schanstra JP, Zollner RL, Villela CA, Nakaie CR, Paiva AC, Pesquero JL, et al. 2006 Role of the kinin B1 receptor in insulin homeostasis and pancreatic islet function. *BiolChem* 387 431-436.

Azizi M, Boutouyrie P, Bissery A, Agharazii M, Verbeke F, Stern N, Bura-Riviere A, Laurent S, Alhenc-Gelas F & Jeunemaitre X 2005 Arterial and renal consequences of partial genetic deficiency in tissue kallikrein activity in humans. *J Clin Invest* 115 780-787.

Balkau B, Lange C, Fezeu L, Tichet J, de Lauzon-Guillain B, Czernichow S, Fumeron F, Froguel P, Vaxillaire M, Cauchi S, et al. 2008 Predicting diabetes: clinical, biological, and genetic approaches: data from the Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR). *Diabetes Care* 31 2056-2061.

Baron AD, Steinberg H, Brechtel G & Johnson A 1994 Skeletal muscle blood flow independently modulates insulin-mediated glucose uptake. *Am J Physiol* 266 E248-253.

Barros CC, Haro A, Russo FJ, Schadock I, Almeida SS, Reis FC, Moraes MR, Haidar A, Hirata AE, Mori M, et al. 2012a Bradykinin inhibits hepatic gluconeogenesis in obese mice. *Lab Invest* 92 1419-1427.

Barros CC, Haro A, Russo FJ, Schadock I, Almeida SS, Ribeiro RA, Vanzela EC, Lanzoni VP, Barros FC, Moraes MR, et al. 2012b Altered glucose homeostasis and hepatic function in obese mice deficient for both kinin receptor genes. *PLoS One* 7 e40573.

Beard KM, Lu H, Ho K & Fantus IG 2006 Bradykinin augments insulin-stimulated glucose transport in rat adipocytes via endothelial nitric oxide synthase-mediated inhibition of Jun NH2-terminal kinase. *Diabetes* 55 2678-2687.

Belin de Chantemele EJ, Mintz JD, Rainey WE & Stepp DW 2011 Impact of leptin-mediated sympatho-activation on cardiovascular function in obese mice. *Hypertension* 58 271-279.

Bergaya S, Hilgers RH, Meneton P, Dong Y, Bloch-Faure M, Inagami T, Alhenc-Gelas F, Levy BI & Boulanger CM 2004 Flow-dependent dilation mediated by endogenous kinins requires angiotensin AT2 receptors. *Circ Res* 94 1623-1629.

Bonnet F, Patel S, Laville M, Balkau B, Favuzzi A, Monti LD, Lalic N & Walker M 2008 Influence of the ACE gene insertion/deletion polymorphism on insulin sensitivity and impaired glucose tolerance in healthy subjects. *Diabetes Care* 31 789-794.

Bosch J, Yusuf S, Gerstein HC, Pogue J, Sheridan P, Dagenais G, Diaz R, Avezum A, Lanus F, Probstfield J, et al. 2006 Effect of ramipril on the incidence of diabetes. *N Engl J Med* 355 1551-1562.

Buleon M, Allard J, Jaafar A, Praddaude F, Dickson Z, Ranera MT, Pecher C, Girolami JP & Tack I 2008 Pharmacological blockade of B2-kinin receptor reduces renal protective effect of angiotensin-converting enzyme inhibition in db/db mice model. *Am J Physiol Renal Physiol* 294 F1249-1256.

Catanzaro OL, Dziubecki D, Obregon P, Rodriguez RR & Sirois P 2010 Antidiabetic efficacy of bradykinin antagonist R-954 on glucose tolerance test in diabetic type 1 mice. *Neuropeptides* 44 187-189.

Damas J, Bourdon V & Lefebvre PJ 1999 Insulin sensitivity, clearance and release in kininogen-deficient rats. *ExpPhysiol* 84 549-557.

Dias JP & Couture R 2012 Blockade of kinin B(1) receptor reverses plasma fatty acids composition changes and body and tissue fat gain in a rat model of insulin resistance. *Diabetes ObesMetab* 14 244-253.

Dietze GJ, Wicklmayr M, Rett K, Jacob S & Henriksen EJ 1996 Potential role of bradykinin in forearm muscle metabolism in humans. *Diabetes* 45 Suppl 1 S110-114.

Duka I, Shenouda S, Johns C, Kintsurashvili E, Gavras I & Gavras H 2001 Role of the B(2) receptor of bradykinin in insulin sensitivity. *Hypertension* 38 1355-1360.

Fallo F, Mulatero P, Vettor R, Scarda A, Della Mea P, Morello F, Veglio F & Williams TA 2004 Bradykinin B2 receptor gene C-58T polymorphism and insulin resistance. A study on obese patients. *HormMetab Res* 36 243-246.

Frossard M, Joukhadar C, Steffen G, Schmid R, Eichler HG & Muller M 2000 Paracrine effects of angiotensin-converting-enzyme- and angiotensin-II-receptor- inhibition on transcapillary glucose transport in humans. *Life Sci* 66 PL147-154.

Griol-Charhbili V, Messadi-Laribi E, Bascands JL, Heudes D, Meneton P, Giudicelli JF, Alhenc-Gelas F & Richer C 2005 Role of tissue kallikrein in the cardioprotective effects of ischemic and pharmacological preconditioning in myocardial ischemia. *Faseb J* 19 1172-1174.

Henriksen EJ, Jacob S, Kinnick TR, Youngblood EB, Schmit MB & Dietze GJ 1999 ACE inhibition and glucose transport in insulinresistant muscle: roles of bradykinin and nitric oxide. *Am J Physiol* 277 R332-336.

Isami S, Kishikawa H, Araki E, Uehara M, Kaneko K, Shirotani T, Todaka M, Ura S, Motoyoshi S, Matsumoto K, et al. 1996 Bradykinin enhances GLUT4 translocation through the increase of insulin receptor tyrosine kinase in primary adipocytes: evidence that bradykinin stimulates the insulin signalling pathway. *Diabetologia* 39 412-420.

Kakoki M, Sullivan KA, Backus C, Hayes JM, Oh SS, Hua K, Gasim AM, Tomita H, Grant R, Nossov SB, et al. 2010 Lack of both bradykinin B1 and B2 receptors enhances nephropathy, neuropathy, and bone mineral loss in Akita diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 10190-10195.

Kishi K, Muromoto N, Nakaya Y, Miyata I, Hagi A, Hayashi H & Ebina Y 1998 Bradykinin directly triggers GLUT4 translocation via an insulin-independent pathway. *Diabetes* 47 550-558.

Kohlman O, Jr., Neves F de A, Ginoza M, Tavares A, Cezaretti ML, Zanella MT, Ribeiro AB, Gavras I & Gavras H 1995 Role of bradykinin in insulin sensitivity and blood pressure regulation during hyperinsulinemia. *Hypertension* 25 1003-1007.

Laatikainen T, Dunbar JA, Chapman A, Kilkkinen A, Vartiainen E, Heistaro S, Philpot B, Absetz P, Bunker S, O'Neil A, et al. 2007 Prevention of type 2 diabetes by lifestyle intervention in an Australian primary health care setting: Greater Green Triangle (GGT) Diabetes Prevention Project. *BMC Public Health* 7 249.

Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N & Roth D 1999 A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 130 461-470.

Liu YH, Yang XP, Mehta D, Bulagannawar M, Scicli GM & Carretero OA 2000 Role of kinins in chronic heart failure and in the therapeutic effect of ACE inhibitors in kininogen-deficient rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278 H507-514.

Mahajan H, Richards SM, Rattigan S & Clark MG 2004 Local methacholine but not bradykinin potentiates insulin-mediated glucose uptake in muscle in vivo by augmenting capillary recruitment. *Diabetologia* 47 2226-2234.

Mather KJ, Steinberg HO & Baron AD 2013 Insulin resistance in the vasculature. *J Clin Invest* 123 1003-1004.

Mayfield RK, Shimojo N & Jaffa AA 1996 Skeletal muscle kallikrein. Potential role in metabolic regulation. *Diabetes* 45 Suppl 1 S20-23.

Meneton P, Bloch-Faure M, Hagege AA, Ruetten H, Huang W, Bergaya S, Ceiler D, Gehring D, Martins I, Salmon G, et al. 2001 Cardiovascular abnormalities with normal blood pressure in tissue kallikrein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 2634-2639.

Messadi-Laribi E, Griol-Charhbili V, Pizard A, Vincent MP, Heudes D, Meneton P, Alhenc-Gelas F & Richer C 2007 Tissue kallikrein is involved in the cardioprotective effect of AT1-receptor blockade in acute myocardial ischemia. *J Pharmacol Exp Ther* 323 210-216.

Mori MA, Araujo RC, Reis FC, Sgai DG, Fonseca RG, Barros CC, Merino VF, Passadore M, Barbosa AM, Ferrari B, et al. 2008 Kinin B1 receptor deficiency leads to leptin hypersensitivity and resistance to obesity. *Diabetes* 57 1491-1500.

Mori MA, Sales VM, Motta FL, Fonseca RG, Alenina N, Guadagnini D, Schadock I, Silva ED, Torres HA, dos Santos EL, et al. 2012 Kinin B1 receptor in adipocytes regulates glucose tolerance and predisposition to obesity. PLoS One 7 e44782.

Nuutila P, Raitakari M, Laine H, Kirvela O, Takala T, Utriainen T, Makimattila S, Pitkanen OP, Ruotsalainen U, Iida H, et al. 1996 Role of blood flow in regulating insulin-stimulated glucose uptake in humans. Studies using bradykinin, [15O]water, and [18F]fluoro-deoxy-glucose and positron emission tomography. J Clin Invest 97 1741-1747.

Ogden CL, Carroll MD, Kit BK & Flegal KM 2012 Prevalence of obesity and trends in body mass index among US children and adolescents, 1999-2010. Jama 307 483-490.

Rett K, Wicklmayr M, Dietze GJ & Haring HU 1996 Insulin-induced glucose transporter (GLUT1 and GLUT4) translocation in cardiac muscle tissue is mimicked by bradykinin. Diabetes 45 Suppl 1 S66-69.

Rothschild AM, Melo VL, Reis ML, Foss MC & Gallo L, Jr. 1999 Kininogen and prekallikrein increases in the blood of streptozotocin-diabetic rats are normalized by insulin in vivo and in vitro. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 360 217-220.

Sarzani R, Salvi F, Dessi-Fulgheri P & Rappelli A 2008 Renin-angiotensin system, natriuretic peptides, obesity, metabolic syndrome, and hypertension: an integrated view in humans. J Hypertens 26 831-843.

Satterfield DW, Volansky M, Caspersen CJ, Engelgau MM, Bowman BA, Gregg EW, Geiss LS, Hoseney GM, May J & Vinicor F 2003 Community-based lifestyle interventions to prevent type 2 diabetes. Diabetes Care 26 2643-2652.

Shiuchi T, Cui TX, Wu L, Nakagami H, Takeda-Matsubara Y, Iwai M & Horiuchi M 2002 ACE inhibitor improves insulin resistance in diabetic mouse via bradykinin and NO. *Hypertension* 40 329-334.

Slim R, Torremocha F, Moreau T, Pizard A, Hunt SC, Vuagnat A, Williams GH, Gauthier F, Jeunemaitre X & Alhenc-Gelas F 2002 Loss-of-function polymorphism of the human kallikrein gene with reduced urinary kallikrein activity. *J Am Soc Nephrol* 13 968-976.

Tschop M & Heiman ML 2002 Overview of rodent models for obesity research. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 9 Unit 9 10.

Tschöpe C, Reinecke A, Seidl U, Yu M, Gavriluk V, Riester U, Gohlke P, Graf K, Bader M, Hilgenfeldt U, et al. 1999 Functional, biochemical, and molecular investigations of renal kallikrein-kinin system in diabetic rats. *Am J Physiol* 277 H2333-2340.

Waeckel L, Potier L, Chollet C, Taveau C, Bruneval P, Roussel R, Alhenc-Gelas F & Bouby N 2012 Antihypertensive role of tissue kallikrein in hyperaldosteronism in the mouse. *Endocrinology* 153 3886-3896.

Williams TD, Chambers JB, Roberts LM, Henderson RP & Overton JM 2003 Diet-induced obesity and cardiovascular regulation in C57BL/6J mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30 769-778.

Yuan G, Deng J, Wang T, Zhao C, Xu X, Wang P, Voltz JW, Edin ML, Xiao X, Chao L, et al. 2007 Tissue kallikrein reverses insulin resistance and attenuates nephropathy in diabetic rats by activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B and adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase signaling pathways. *Endocrinology* 148 2016-2026.

Fig. 1 Body weight gain and fat mass of TK deficient (TK^{-/-}) and control wild type (TK^{+/+}) mice, fed standard (SD) or high fat diet (HFD). Body weight (a), body weight gain (b) during 19 weeks of diet. Fat and lean mass (c). Data are means \pm SEM. n=7-16 per group. Two-way ANOVA followed by Fisher PLSD test, high fat vs standard diet: * $p < 0.05$; TK^{-/-} vs TK^{+/+}: † $p < 0.05$.

Fig.2 Glucose tolerance test in TK deficient (TK^{-/-}) and wild type (TK^{+/+}) mice, fed standard (SD) or high fat diet (HFD). Blood glucose concentration and area under curve of glycemia at 10 weeks (A, B) and 16 weeks (C, D) of diet. Plasma insulin concentration and area under curve of insulinemia at 16 weeks of diet (E, F). Data are means \pm SEM. n=7-16 per group. Two-way ANOVA followed by Fisher PLSD test, high fat vs standard diet: * $p < 0.05$; TK^{-/-} vs TK^{+/+}: non significant.

Fig. 3 Insulin tolerance test in TK deficient (TK^{-/-}) and wild type (TK^{+/+}) mice, fed standard (SD) or high fat diet (HFD). Relative values of the insulin tolerance test (ITT) and area under curve of glycemia at 10 weeks (a, b) and 16 weeks (c, d) of diet. Data are means \pm SEM. n=7-16 per group. Two-way ANOVA followed by Fisher PLSD test, high fat vs. standard diet: * $p < 0.05$; TK^{-/-} vs. TK^{+/+}: non significant.

Fig. 4 Body weight gain in ob/ob TK deficient mice (ob-TK^{-/-}) and ob/ob control (ob-TK^{+/+}) mice. Body weight (a) and weight gain (b) between 9 and 22 weeks of age. Data are means \pm SEM. n=7-8 per group.

Fig. 5 Responses to glucose tolerance test of ob/ob TK deficient mice (ob-TK^{-/-}) and ob/ob control mice (ob-TK^{+/+}). Blood glucose concentration and area under curve of glycemia at 13 weeks (a, b) and 19 weeks (c, d) of age. Data means \pm SEM. n=7-8 per group.

Fig. 6 Insulin tolerance test in ob/ob TK deficient mice (ob-TK^{-/-}) and control ob/ob (ob-TK^{+/+}) mice. Relative values of the insulin tolerance test (ITT) and area under curve of glycemia at 13 weeks (a, b) and 19 weeks (c, d) of age. Data are means \pm SEM. n=7-8 per group.

Supplementary Fig. 1: Glucose (a, b) and insulin tolerance test (c, d) in 12 month old ob/ob TK deficient mice (ob-TK^{-/-}) and control ob/ob (ob-TK^{+/+}) mice. Data are means \pm SEM. n=7-8 per group.

Table 1: Blood pressure and heart rate in wild type (TK+/+) and TK deficient (TK-/-) mice, fed standard or high fat diet for 18 weeks

	Standard Diet		High Fat Diet	
	TK+/+	TK-/-	TK+/+	TK-/-
n	7	16	12	13
SBP (mmHg)	108 ± 4	116 ± 3	113 ± 4	109 ± 3
DBP (mmHg)	76 ± 6	83 ± 3	75 ± 4	80 ± 4
Heart Rate (bpm)	594 ± 16	587 ± 12	655 ± 5*	646 ± 11*

SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure. Data are means ± SEM. Two-way ANOVA followed by Fisher PLSD test, high fat vs. standard diet: * p<0.05; TK-/- vs. TK+/+: non significant.

Table 2: Demographic features and clinical and metabolic profiles of the DESIR population without diabetes at baseline according to Tissue Kallikrein rs5515 (R53H) genotype.

	RR	RH+HH	p
Number	4465	353	
Age (years)	46.7 ± 10.0	46.3 ± 10.3	0.48
Sex male n (%)	2210 (49.2)	183 (51.1)	0.49
Weight (kg)	68.2 ± 12.8	67.6 ± 12.9	0.22
BMI (kg/m ²)	24.6 ± 3.8	24.4 ± 3.7	0.16
Waist to hip ratio	0.85 ± 0.09	0.85 ± 0.9	0.26
FPG (mmol/l)	5.31 ± 0.64	5.29 ± 0.56	0.12
HOMA-IR	0.87 [0.62]	0.87 [0.64]	0.15
Insulinemia (pmol/l)	39.5 [27.7]	39.4 [29.0]	0.15
eGFR (ml/min.1.73m ²)	83.3 ± 14.0	84.1 ± 13.5	0.47
SBP (mmHg)	131 ± 16	130 ± 14	0.24
DBP (mmHg)	80 ± 10	79 ± 9	0.37
HR (bpm)	67.3 ± 10.0	67.9 ± 10.2	0.25

RH heterozygote subjects: n=351, HH homozygote subjects: n=7. BMI: body mass index, FPG: fasting plasma glucose, SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure, HR: heart rate. Data are means ± SEM except for HOMA-IR and insulinemia which are medians [Interquartile Range]. Comparison was made by Student's t test for continuous variables or Chi-2 test for categorical variables when appropriate.

Table 3: D.E.S.I.R. study: body mass index (BMI), fasting plasma glucose (FPG), HOMA-IR, fasting insulinemia, systolic blood pressure (SBP) and heart rate (HR) at baseline, 3, 6 and 9 years, according to TK genotype.

	baseline		3 years		6 years		9 years		p genotype	p time	p interaction
	RR	RH+HH	RR	RH+HH	RR	RH+HH	RR	RH+HH			
BMI (kg/m²)	24.5 ± 3.6	24.5 ± 3.5	25.0 ± 3.8	25.0 ± 3.7	25.4 ± 4.0	25.4 ± 3.8	25.7 ± 4.1	25.8 ± 4.0	0.87	<0.0001	0.31
FPG (mmol/l)	5.3 ± 0.5	5.3 ± 0.5	5.3 ± 0.6	5.3 ± 0.6	5.4 ± 0.7	5.3 ± 0.7	5.4 ± 0.8	5.4 ± 0.6	0.28	<0.0001	0.18
HOMA-IR	0.98 [0.62]	0.97 [0.64]	1.11 [0.69]	1.10 [0.65]	1.15 [0.77]	1.12 [0.75]	1.35 [0.85]	1.28 [0.79]	0.35	<0.0001	0.69
Insulinemia (pmol/l)	39.5 [27.7]	39.4 [29.0]	43.7 [30.8]	40.9 [28.7]	44.5 [35.1]	42.3 [34.4]	51.6 [38.7]	48.4 [36.6]	0.21	<0.0001	0.93
SBP (mmHg)	131 ± 15	131 ± 15	130 ± 16	130 ± 16	134 ± 19	135 ± 19	136 ± 19	135 ± 19	0.56	<0.0001	0.92
HR (bpm)	66 ± 10	68 ± 10	67 ± 10	67 ± 11	68 ± 11	69 ± 11	68 ± 11	68 ± 11	0.28	<0.0001	0.08

RR: homozygote R53 subjects (n=3179). RH: R53H subjects (n=252); HH: homozygote H53 subjects (n=5). Patients with missing data at any time during the follow-up could not participate to this ANOVA for repeated measurement, adjusted on sex, age and BMI. Data are means ± SD except for HOMA-IR and insulinemia which are medians [Interquartile Range].

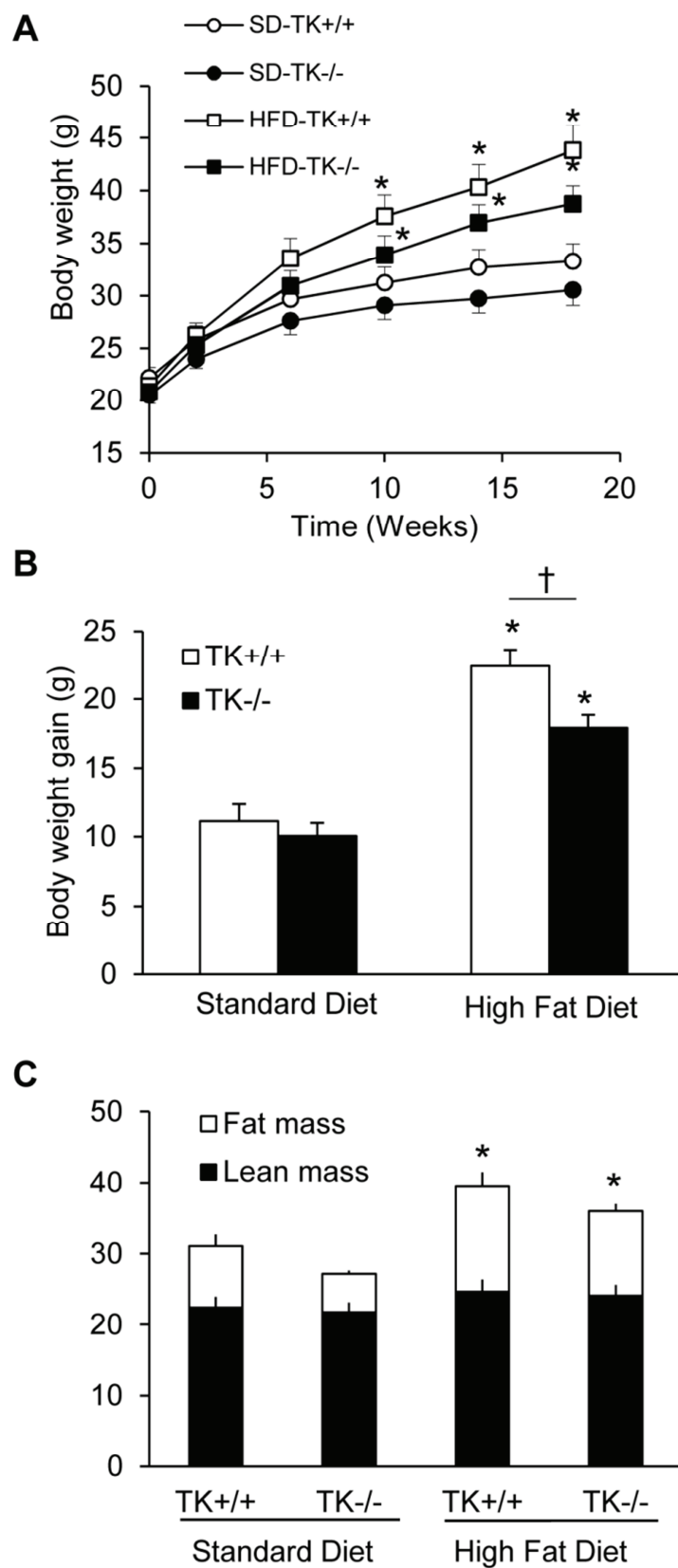
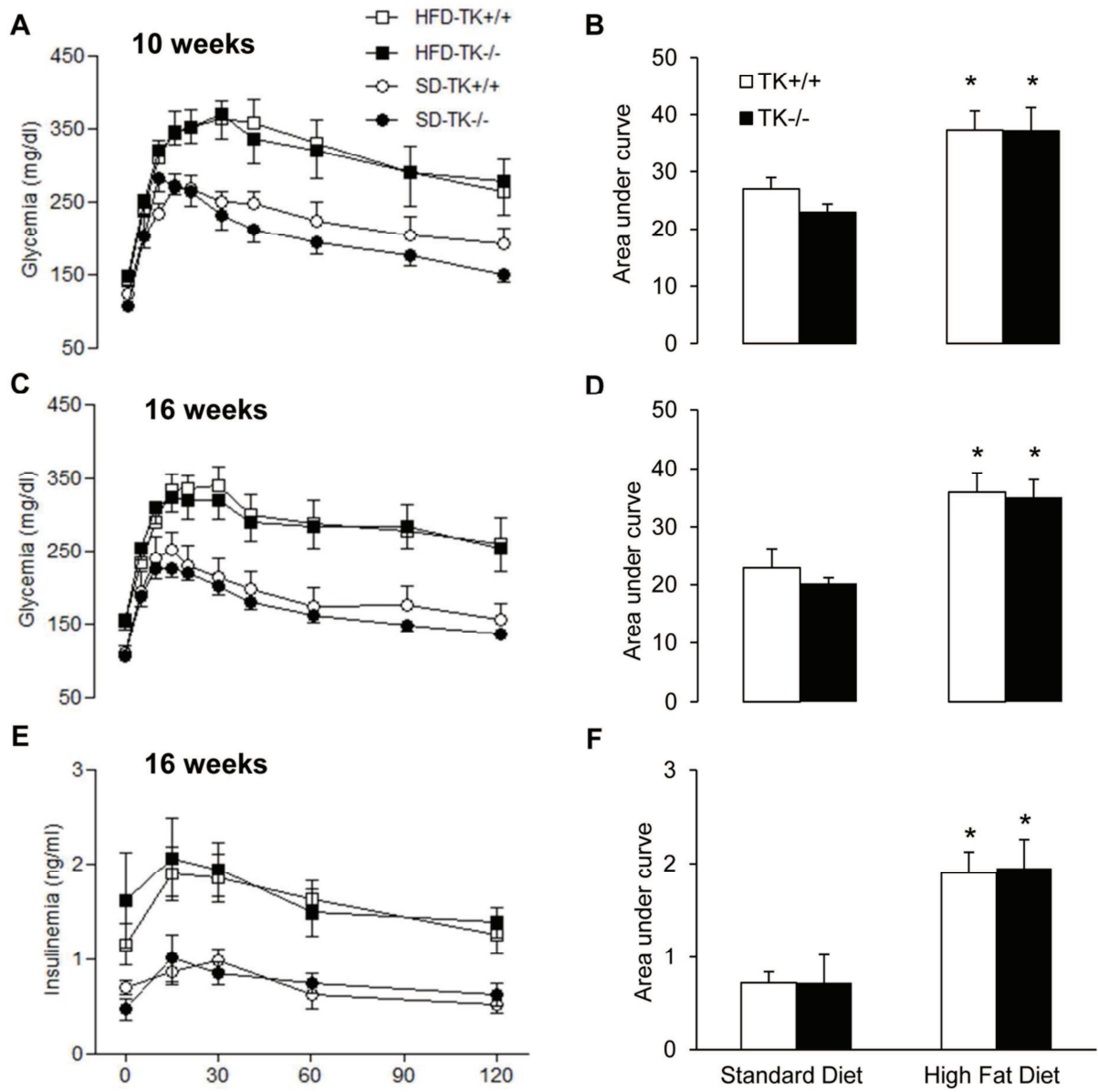


Figure 1



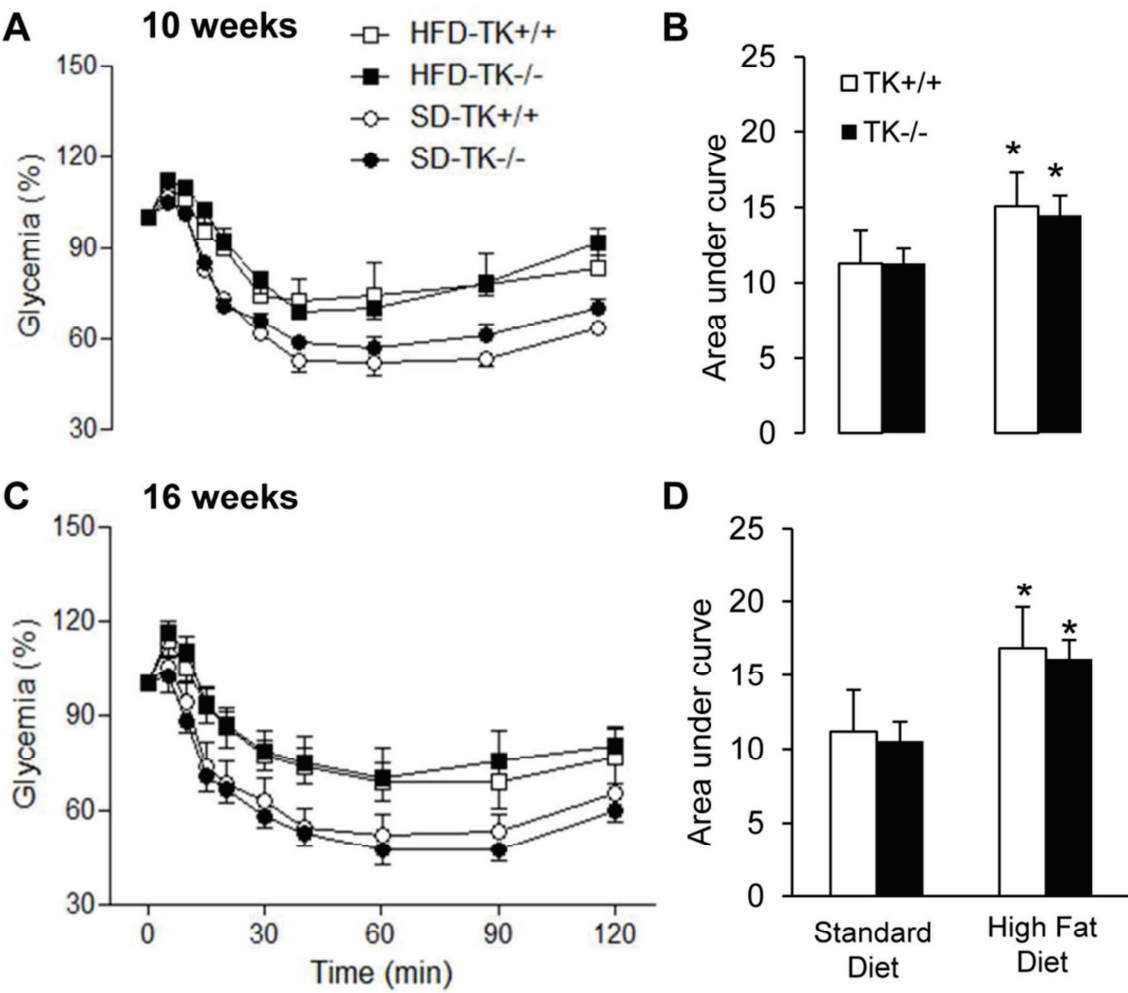


Figure 3

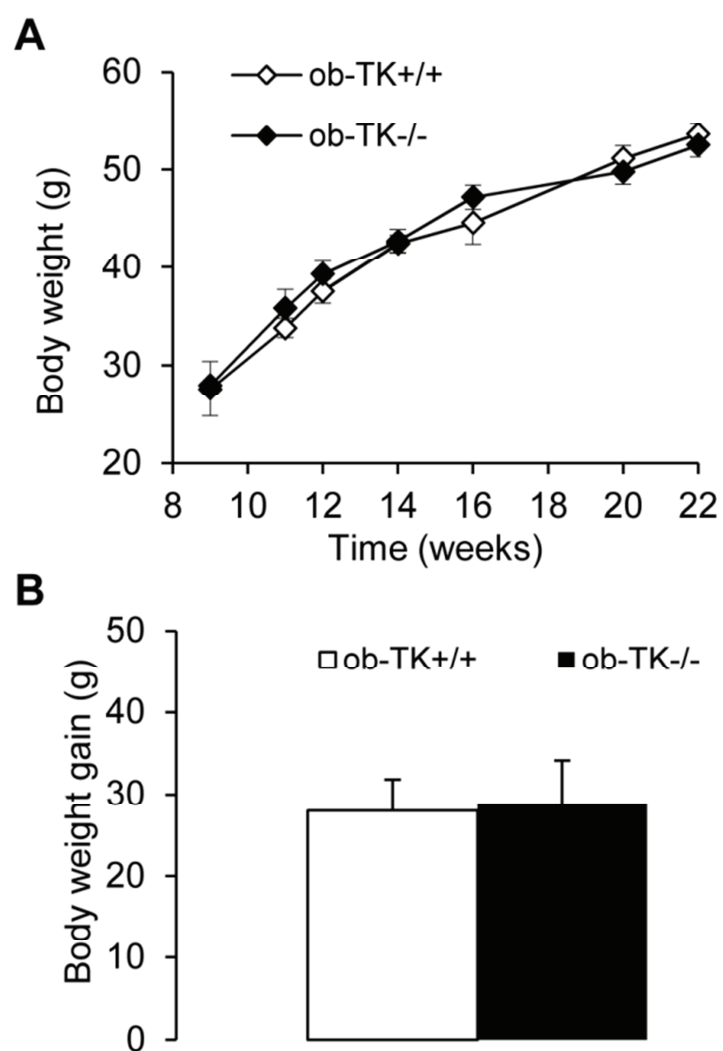


Figure 4

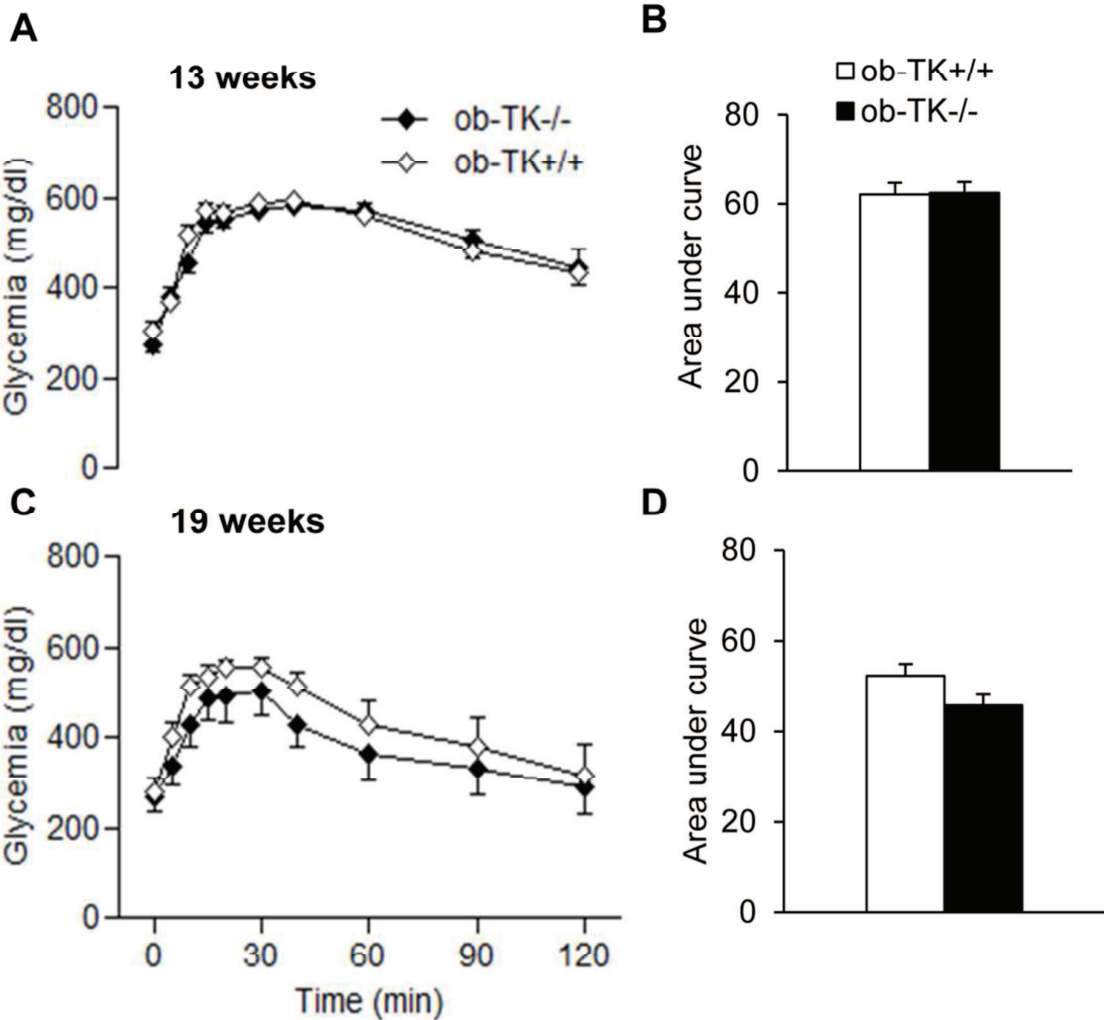


Figure 5

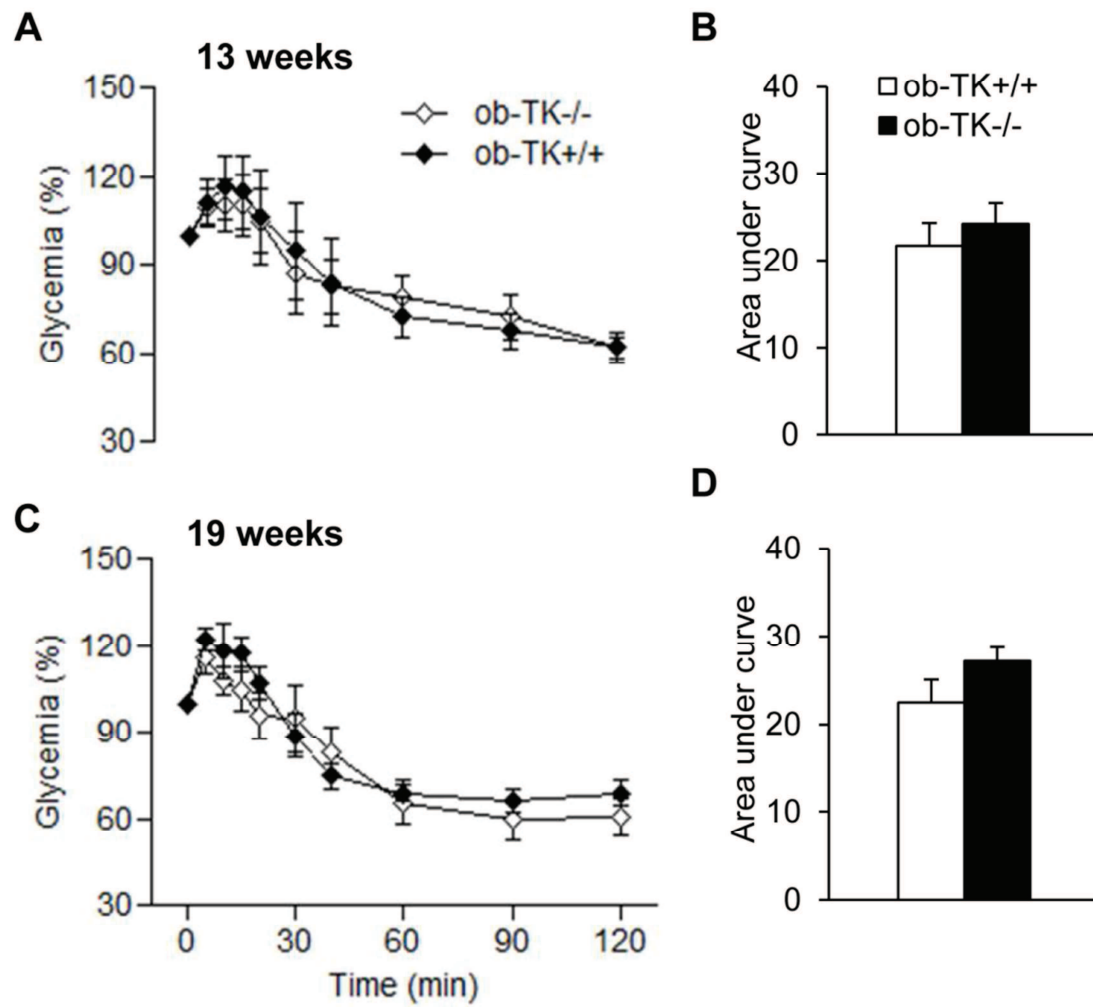
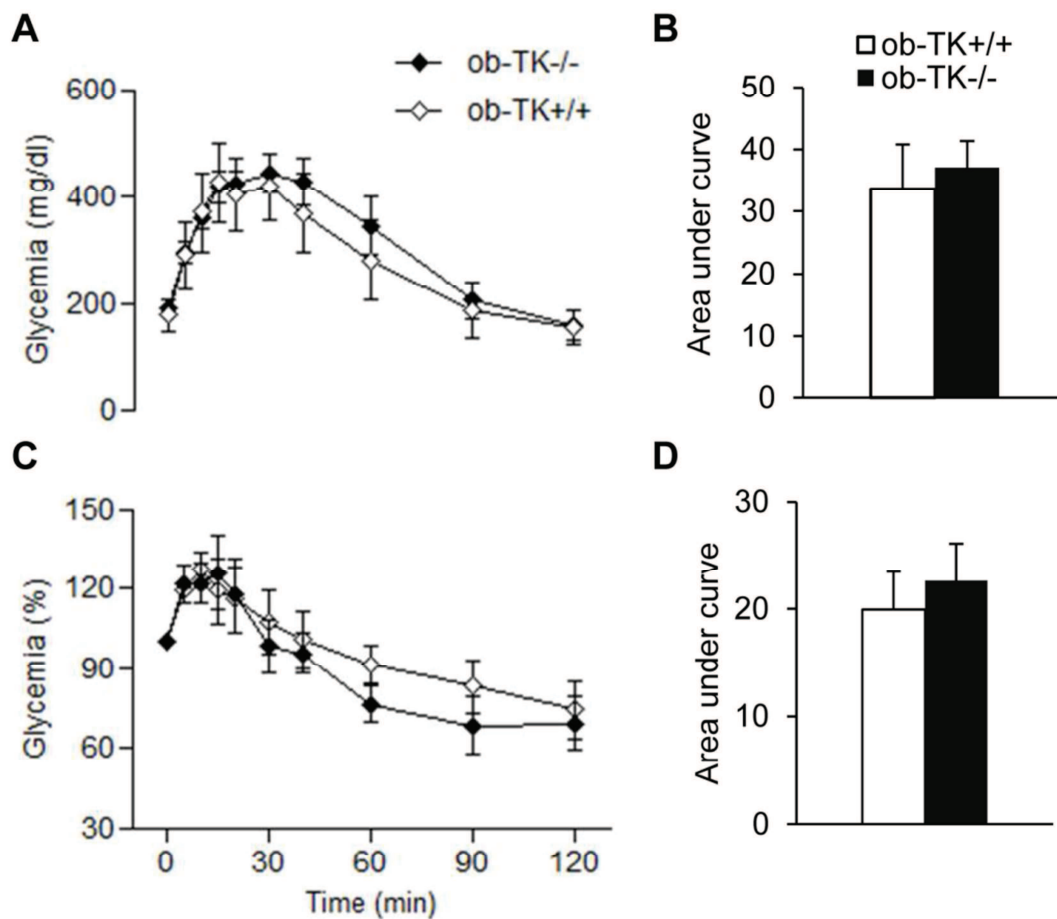


Figure 6

Supplementary figure 1



Glucose (a, b) and insulin tolerance test (c, d) in 12 month old ob/ob TK deficient mice (ob-TK^{-/-}) and control ob/ob (ob-TK^{+/+}) mice. Data are means \pm SEM. n=7-8 per group.

Supplementary figure

Supplementary Table 1: Inguinal and mesenteric fat mass in control ob/ob (ob-TK+/+) and ob/ob TK deficient (ob-TK-/-) mice

	ob-TK+/+	ob-TK-/-
n	8	7
BW (g)	56 ± 2	57 ± 2
Inguinal Fat (g)	1.77 ± 0.31	2.27 ± 0.48
Mesenteric Fat (g)	1.88 ± 0.14	1.91 ± 0.29

BW: body weight. Data are means ± SEM.

3. DISCUSSION ET CONCLUSION

Cette étude montre que le déficit partiel ou complet en TK ne modifie pas le risque de développement d'anomalie du métabolisme glucidique chez l'homme et dans deux modèles d'obésité et de diabète de type 2 chez la souris. Ces résultats négatifs n'étaient pas attendus au vu de l'hypothèse initiale d'un rôle positif du SKK dans le métabolisme glucidique. Cependant, cette étude est la première à notre connaissance à avoir étudié spécifiquement la déficience en TK dans des modèles murins et dans une population générale humaine.

3.1. Etudes expérimentales

Il existe des données dans la littérature en faveur d'un rôle de la TK dans le métabolisme glucidique. En effet, l'équipe de Zeldin et Wang ont étudié l'effet d'une thérapie génique par transfection génique du gène de la TK humaine dans plusieurs modèles de diabète. Ils observent une diminution de l'insulinémie dans chacun de leur modèle sans modification toutefois de la glycémie, en faveur donc d'une amélioration de l'insulinosensibilité comme en témoigne les HOMA-IR diminués dans le groupe traité par le transgène (135, 137). Cependant, les modèles utilisés diffèrent des nôtres par plusieurs points : il s'agit à chaque fois de rats, les modèles de diabète choisis sont des modèles de diabète induit par régime riche en fructose et un modèle de diabète associant régime gras suivi d'une injection d'une dose faible de streptozotocine puis d'un régime enrichi en glucose. De plus, aucune exploration du métabolisme, autre que des dosages statiques, n'est réalisée dans ces études. De façon contradictoire, la transfection du gène de la TK humaine, cette fois dans un modèle de diabète de type 1, induit par la streptozotocine, entraîne une amélioration de la glycémie à jeun sans effet sur l'insulinémie (138). Il est à noter de plus que ce sont des modèles d'activation du système contrairement à notre modèle génétique murin à l'origine d'une déficience totale en kinines (136).

Même si le rôle de la TK dans le métabolisme glucidique ne semble pas clair au vu des données de la littérature, l'implication des récepteurs B1R et B2R dans les troubles métaboliques est mieux documentée. Il semble que chaque récepteur ait un rôle différent dans la régulation des processus métaboliques. Ainsi, le B1R aurait un rôle métabolique délétère au contraire du B2R dont les effets seraient bénéfiques.

Les souris déficientes en B1R soumises à régime gras présentent une amélioration de leur sensibilité à l'insuline et sont protégées de la prise de poids induite par le régime gras (139). De la même manière, un antagoniste sélectif du B1R améliore la glycémie et diminue l'hyperinsulinémie chez des rats sous régime enrichi en glucose (140). En revanche, des souris ob/ob déficientes en B1R ne présentent pas de protection métabolique (139). Ces résultats sont partiellement similaires aux nôtres puisque nous observons une moindre prise de poids des souris TK-/- sous régime gras mais pas d'effet chez les souris ob/ob. Ces résultats suggèrent que le SKK participe à la régulation de la balance énergétique en modulant la sensibilité à la leptine. Cette hypothèse est confortée par l'observation d'une surexpression du B1R dans le foie et le tissu adipeux des souris ob/ob (141). Il est à noter également que le B1R a été impliqué dans la pathogénèse du diabète de type 1 probablement du fait de son rôle dans le processus inflammatoire pancréatique caractérisant le diabète de type 1 (142, 143). Le rôle du B1R dans les processus inflammatoires et l'importance de ces phénomènes inflammatoires dans la pathogénèse du DT2 et du type 1 peut être une des explications aux effets délétères du B1R dans la régulation de l'homéostasie glucidique (144, 145). Cependant, contrairement aux souris KO pour le B1R, nous n'observons pas de différence sur les paramètres glucidiques (ITT et GTT) entre les souris sauvages et TK-/- sous régime standard ou régime gras. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces différences. Tout d'abord, les souches sont différentes (C57Bl6 contre fond génétique mixte C57Bl6/Sv129) et le protocole

de GTT est légèrement différent puisque les souris sont laissées à jeun toute la nuit contrairement à notre protocole où le jeûne est de 5h.

L'autre hypothèse est liée au rôle du B2R. Celui-ci est surexprimé chez les souris déficientes en B1R notamment au niveau du foie, organe clé de la régulation de l'homéostasie glucidique (146). Les effets bénéfiques observés en cas de déficience du B1R pourraient ainsi être liés à la surexpression induite du B2R chez ces souris. Il semble en effet que contrairement au B1R, le B2R soit impliqué de façon positive dans les processus métaboliques. Chez le rat, l'inhibition pharmacologique du B2R diminue la captation du glucose musculaire et la sensibilité à l'insuline (131). De même, des études *in vivo* sur des cellules musculaires et des adipocytes ont montré que la bradykinine, via l'activation du B2R, stimule la translocation de GLUT4 à la membrane et augmente la captation cellulaire de glucose (133, 134). L'ensemble de ces données est en faveur d'un rôle double du SKK via l'action de chaque récepteur sur les processus métaboliques avec une action protectrice du B2R et délétère du B1R. Cette dualité d'action des récepteurs, associée au fait que l'inactivation génétique ou pharmacologique de l'un conduit à la surexpression compensatrice de l'autre, peut rendre difficile l'interprétation des données issues de ces modèles. Les phénomènes observés sont-ils liés à l'inhibition d'un récepteur ou à la surexpression compensatrice de l'autre ? Le modèle de souris inactivée pour la TK utilisé dans cette étude présente l'avantage de n'avoir aucune stimulation des récepteurs puisque ces souris sont incapables de produire des kinines (136). Nos données suggèrent que l'inactivation totale du SKK n'a pas d'effet sur les troubles métaboliques induits par le régime gras et la déficience en leptine. Ainsi les résultats contradictoires entre les données de la littérature et nos données peuvent être liés à l'inhibition complète du système dont les effets positifs (ceux du B2R) et négatifs (ceux du B1R) s'annulent mutuellement. Cependant une étude récente de Barros et al. a montré que l'inactivation génétique des deux récepteurs simultanément, exacerbe

l'insulinorésistance et la stéatose hépatique de souris ob/ob. Cependant, contrairement à notre étude, seul des femelles sont utilisées dans cette étude et les différences apparaissent seulement chez les souris de plus de 6 mois de vie. Malgré la réalisation de GTT à des animaux plus âgés (6 mois à 1 an), nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence entre les 2 groupes.

Une autre hypothèse pour expliquer ces résultats négatifs pourrait être la possibilité que d'autres voies d'activation des kinines, TK-indépendantes, soit activées dans ces modèles d'obésité. Il a été montré que la prékallicréine plasmatique, un enzyme kininogénase présent sous forme inactivée à l'état basal, était activée dans un modèle de rat insulinopénique (147, 148). Cependant aucune donnée n'est disponible dans des modèles d'obésité et d'insulinorésistance. Afin de vérifier l'absence de formation de kinines chez les souris TK-/- obèses, il aurait fallu mesurer la production de kinines dans nos modèles.

L'absence d'effet sur la pression artérielle observée dans nos deux modèles d'obésité confirme les données de la littérature sur les souris soumises à un régime gras ou déficientes en leptine (149-151). Cependant, l'ensemble de ces données ne sont pas toutes concordantes et il existe de nombreux résultats contradictoires (149, 150, 152-157). Ces discordances sont probablement le reflet des différences méthodologiques de la mesure de pression, de la souche, de l'âge de souris et d'autres paramètres difficilement quantifiables. Nos données sur la pression artérielle, chez nos modèles et dans les conditions du laboratoire, montrent l'absence d'effet de l'obésité sur la pression artérielle, contrairement à ce qui est retrouvé fréquemment chez l'homme. Nous ne retrouvons pas également d'effet de la déficience en TK sur la pression artérielle. L'absence d'effet dans le groupe contrôle était attendu (136) alors que nous montrons ici pour la première fois l'absence de rôle de la TK sur les paramètres tensionnels dans des modèles d'obésité. Cependant, il a été montré que la déficience en TK

pouvait avoir un rôle sur la pression artérielle dans une situation d'hyperaldostéronisme et de régime hypersodé (158).

3.2. Etude de population humaine

Nos résultats obtenus chez la souris dans deux modèles distincts d'obésité et d'insulinorésistance, sont corroborés par nos résultats obtenus chez l'homme dans la cohorte DESIR (Données Epidémiologiques sur le Syndrome d'Insulino-Résistance). Celle-ci est une cohorte d'individus de la population générale, non sélectionnés et recrutés dans des centres de sécurité sociale de l'ouest de la France (Angers, Blois, Chartres, Orléans et Tours). Les 5214 sujets recrutés dans cette cohorte ont été suivis 9 ans avec un recueil tous les 3 ans de nombreuses données clinico-biologiques. L'objectif initial de cette cohorte, comme son nom l'indique, était l'identification des facteurs de risque d'insulinorésistance et donc de développement de troubles glucidiques. Cette cohorte permet notamment d'étudier l'effet d'un polymorphisme génétique sur le risque de complications métaboliques.

La substitution de G par A dans l'exon 3 du gène de la TK entraîne un remplacement de l'histidine par l'arginine en position 53 dans la séquence d'acides aminés de la TK. La présence de l'allèle 53H est associée à une forte diminution de l'activité de la TK chez les individus hétérozygotes (R53H). En effet, il a été montré chez les sujets hétérozygotes que l'activité de la TK était diminuée de 50 à 90% en fonction des apports potassiques et sodés (159, 160). De plus, le polymorphisme R53H a une conséquence physiologique puisque les patients hétérozygotes présentent une dysfonction artérielle particulière, caractérisée par une augmentation chronique des forces de cisaillement (shear stress) artérielles, associée à une diminution de la lumière et du diamètre artériels suggérant un remodelage artériel inapproprié (160). Ces données montrent donc que la présence de

l'allèle 53H même à l'état hétérozygote à une conséquence sur l'activité de la TK et sur la physiologie artérielle.

Dans notre étude, nous avons montré que l'allèle 53H, à l'état hétérozygote, n'a aucune conséquence sur la prise de poids, la glycémie, l'insulinémie, l'insulinorésistance et la pression artérielle. Nos données sont les premières à avoir analysées spécifiquement l'effet d'un polymorphisme fonctionnel de la TK sur l'évolution de paramètres métaboliques dans une large cohorte humaine avec un suivi de 9 ans. L'effet de variants alléliques du récepteur B2 a en revanche été étudié par deux autres équipes. Alors que le polymorphisme C58T n'est pas associé au niveau d'insulinorésistance dans une population de patients obèses non diabétiques, le polymorphisme +9/-9 semble associé au risque de diabète et à la valeur de la glycémie à jeun dans une population générale brésilienne. Ainsi la prévalence du diabète chez les porteurs de l'allèle +9 (homozygote et hétérozygote) est plus importante que chez les homozygotes -9/-9. Cependant, les conséquences physiologiques de ce polymorphisme ne sont pas prouvées, il a juste été montré que l'allèle +9 était associé à une diminution de l'activité transcriptionnelle du B2R (161). Si ce polymorphisme était effectivement associé à une diminution du B2R et à un risque plus élevé de diabète, cela serait compatible avec les données expérimentales de la littérature sur le rôle bénéfique du B2R dans l'homéostasie glucidique.

Une limite de notre étude est le faible nombre de sujets homozygotes pour l'allèle 53H. L'analyse statistique a ainsi dû être réalisée en groupant les sujets homozygotes et hétérozygotes pour les comparer aux sujets R53R. En effet, la très faible fréquence des sujets H53H (n=6) est à l'origine d'un manque d'homogénéité de ce groupe. Les résultats en fonction des 3 polymorphismes sont présentés en annexe. On observe une dispersion importante des résultats des homozygotes 53H, associés de plus à des variations dans le temps. Alors que l'on observe une augmentation de l'indice de masse corporelle, de la

glycémie, de l'insulinémie et la pression artérielle systolique au cours du temps lorsque que l'échantillon est assez grand (groupe RR et RH), ces paramètres, dans le groupe HH, augmentent et diminuent successivement durant les 9 ans de suivi. Ces fluctuations et cette dispersion ne permettent donc pas la comparaison statistique des 3 groupes de polymorphisme ensemble. Cependant, nous avons vu que la présence de l'allèle 53H même à l'état hétérozygote entraînait une diminution de l'activité de la TK associé à un phénotype artériel.

3.3. Conclusion

Nous avons donc montré que le déficit partiel ou total en TK, respectivement chez l'homme et la souris, n'avait pas de conséquence sur la survenue de trouble du métabolisme glucidique. Alors que de nombreux arguments expérimentaux sont en faveur d'un rôle des récepteurs B1 et B2, nos données suggèrent que la TK n'est pas impliquée dans la régulation glucidique. Une des explications à ces résultats contradictoires peut être l'effet opposé de chaque récepteur. En effet, l'absence de stimulation de l'un et l'autre dans notre modèle d'étude pourrait conduire à un effet neutre alors que l'activation ou l'inhibition de chaque récepteur séparément entraîne des effets physiologiques. Cette hypothèse pourrait ouvrir une voie vers d'autres études, notamment l'utilisation d'agoniste spécifique de chaque récepteur.

CHAPITRE VI : EFFETS DE NOUVEAUX AGONISTES DES KININES DANS LES LESIONS D'ISCHEMIE REPERFUSION CARDIAQUE CHEZ LA SOURIS NON DIABETIQUE ET DIABETIQUE.

1. INTRODUCTION

Les pathologies ischémiques artérielles (accident vasculaire cérébral, infarctus du myocarde, artériopathie oblitérante des membres inférieurs) sont des pathologies extrêmement fréquentes. Parmi celles-ci l'ischémie myocardique est la première cause de mortalité dans le monde (Figure 6). L'infarctus du myocarde, occlusion aiguë d'un vaisseau coronarien, également appelé syndrome coronarien aigu, est une urgence nécessitant une prise en charge médicale précoce afin de revasculariser le myocarde ischémié le plus rapidement possible. La revascularisation coronaire, par thrombolyse ou angioplastie coronaire, permet la reperfusion myocardique. Toutefois, la reperfusion, même si elle est nécessaire pour éviter les lésions irréversibles de l'ischémie, s'accompagne d'effets délétères, limitant les bénéfices de la revascularisation. Ce phénomène est appelé ischémie-reperfusion (IR). Il existe des méthodes mécaniques ou pharmacologiques permettant de limiter les lésions de l'IR. Ces traitements, appliqués avant l'ischémie ou au moment de la reperfusion après l'ischémie, définissent respectivement le préconditionnement et le postconditionnement.

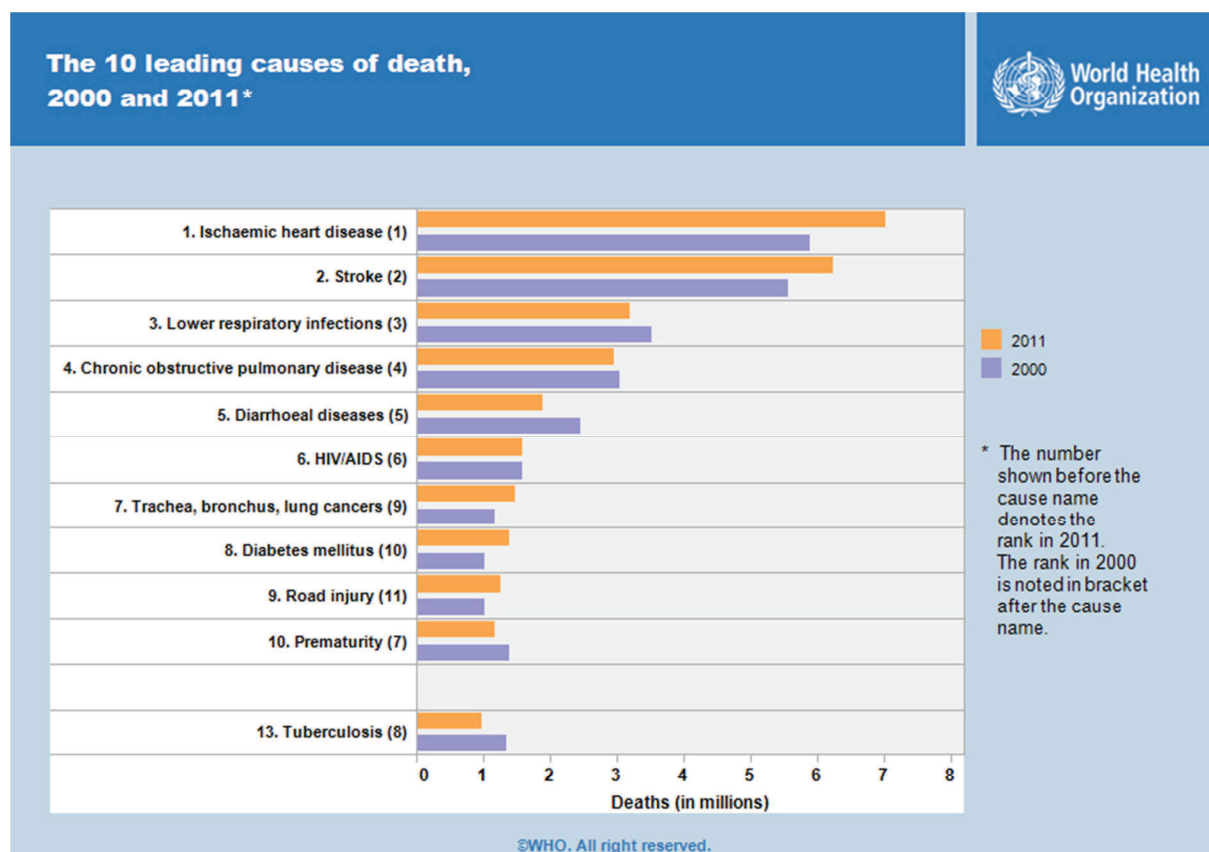


Figure 5: Causes de mortalité dans le monde en 2000 et 2011 (Données OMS, Department of HealthStatistics and Information Systems, 2013)

Parmi les facteurs à l'origine de la coronaropathie, le diabète est un facteur de risque majeur. Il a été bien montré que les hommes diabétiques avaient un risque 2 à 3 fois plus important de développer une coronaropathie que la population non diabétique avec un risque encore plus élevé chez les femmes diabétiques (162 , 163 , 164 , 165). Le diabète est ainsi souvent considéré comme un équivalent coronarien : le risque cardiovasculaire d'un diabétique sans antécédent cardiovasculaire équivaldrait à celui d'un patient non diabétique avec antécédent d'infarctus du myocarde (166). Il semble cependant qu'avec l'amélioration des stratégies de prévention ce concept d'équivalence ne s'observe qu'après une longue durée d'exposition à l'hyperglycémie (167). Même chez les patients à très hauts risque cardiovasculaire, le diabète représente encore un sur-risque de mortalité cardiovasculaire et de survenue d'un infarctus du myocarde (168).

Les atteintes coronariennes sont responsables de la majorité de la morbidité et de la mortalité des patients diabétiques. De plus, le diabète augmente la morbi-mortalité après syndromes coronariens aigus. Quel que soit la sévérité de la présentation clinique, le risque d'infarctus et de décès aigu est plus élevé chez les patients diabétiques présentant un événement coronarien aigu que chez les sujets non diabétiques (169 , 170 , 171). De même, en cas de diabète le pronostic à plus long terme est moins bon du fait d'une augmentation des récurrences, des insuffisances cardiaque et des décès (172).

Le risque coronarien est également dépendant de l'équilibre glycémique. L'étude UKPDS a bien montré la relation linéaire entre le taux d'infarctus du myocarde et le niveau d'HbA1c de diabétique de type 2. Ainsi une réduction de 1 point de l'hémoglobine glyquée, diminue le taux d'infarctus du myocarde de 14% (173).

Malgré l'amélioration de la prise en charge des syndromes coronariens aigus et des stratégies de prévention, il persiste encore un risque majeur d'évènements coronariens chez les patients diabétiques avec un pronostic moins bon dans cette population après infarctus du myocarde. Il est donc nécessaire de développer des traitements spécifiques afin de réduire cette morbi-mortalité.

2. ISCHEMIE-REPERFUSION CARDIAQUE

La reperfusion myocardique en urgence, par thrombolyse ou angioplastie transluminale, est le traitement le plus efficace pour diminuer la taille des lésions ischémiques et réduire les conséquences cliniques de l'ischémie (174). La reperfusion n'est toutefois efficace que si elle est appliquée suffisamment tôt. En effet il existe un délai critique au-delà duquel les lésions ischémiques sont irréversibles et ne peuvent plus bénéficier de la

reperfusion. Ce délai varie entre les espèces, il semble être de 6 heures chez l'homme. Cependant, la restauration aiguë du flux sanguin coronarien après occlusion est une « épée à double tranchant ». L'IR est en effet un phénomène pathologique caractérisé par une phase initiale de restriction des apports sanguins notamment en oxygène, suivi d'une restauration brutale de la perfusion myocardique et donc de la réoxygénation des cardiomyocytes. L'IR peut ainsi et paradoxalement limiter les bénéfices attendus de la reperfusion (Figure 7). Ainsi, ce phénomène peut en partie expliquer pourquoi, malgré une reperfusion myocardique précoce, la mortalité après syndrome coronarien aigu reste de 10% et le taux d'insuffisance cardiaque de 25% (175). Il est donc nécessaire de développer des stratégies thérapeutiques permettant de limiter ces complications.

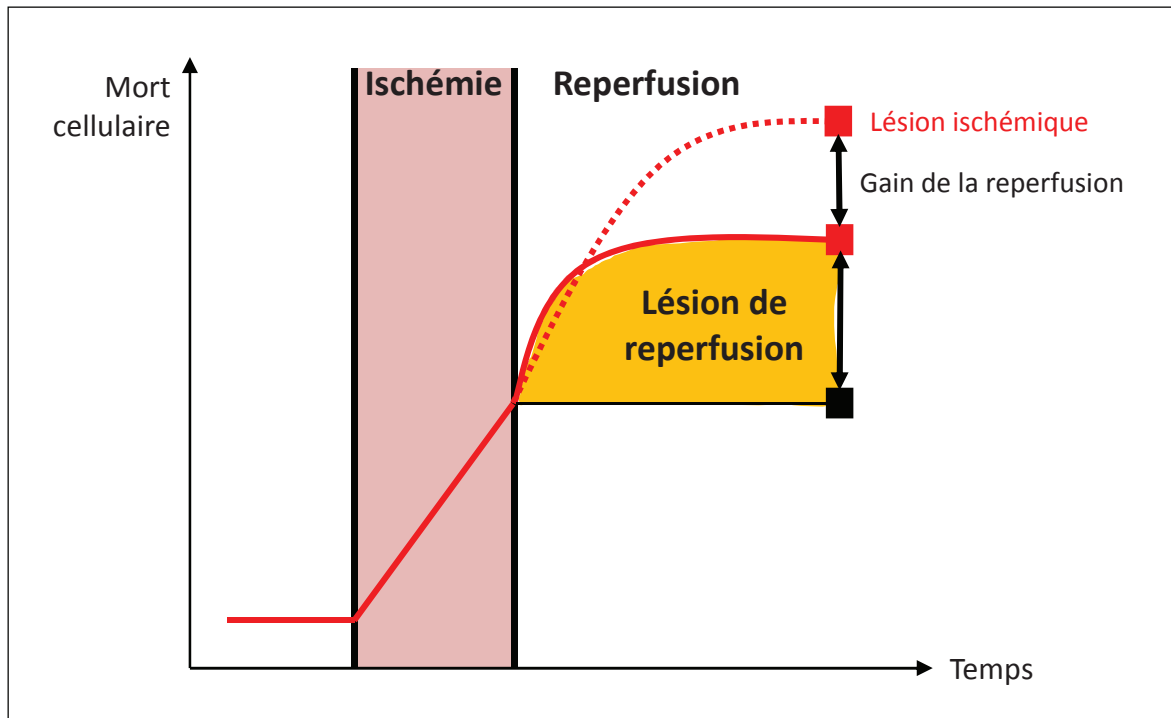


Figure 6 : Schématisation du concept de lésions d'ischémie reperfusion. Au cours de l'ischémie, en l'absence de reperfusion, les lésions ischémiques vont progressivement conduire à la mort cellulaire et évoluer jusqu'à la nécrose de l'ensemble du tissu ischémié (ligne pointillé rouge). La reperfusion interrompt le processus de mort cellulaire ischémique mais entraîne des lésions cellulaires qui se surajoutent à celles dues à la période ischémique: les lésions de reperfusion. Le résultat net, cependant, est que le tissu reperfusé subit moins de mort cellulaire qu'en l'absence de reperfusion. (D'après (176))

2.1. Mécanismes

Les mécanismes à l'origine des lésions d'IR sont multiples et pas encore complètement tous compris. La restauration aiguë de l'apport en oxygène après une ischémie plus ou moins prolongée est un phénomène brutal, ayant des répercussions délétères sur une cellule dont le métabolisme s'est réorienté vers un état anaérobie. Ainsi l'oxygène joue un rôle paradoxal puisqu'il limite les lésions de l'ischémie mais est à l'origine de perturbations cellulaires délétères notamment par la génération de stress oxydant (177).

2.1.1. Rôle du calcium

Au moment de la reperfusion, on observe un pic de calcium intracytoplasmique. Celui est secondaire à la correction de l'acidose mettant en jeu l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, à des anomalies du réticulum sarcoplasmique qui va relarguer du calcium dans le cytoplasme (178-180). Cette augmentation brutale du taux de calcium intracellulaire va induire une hypercontraction pathologique des myofibrilles ainsi que l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial (mitoPTP) (181). L'ensemble de ces événements vont aboutir à la mort cellulaire.

2.1.2. Rôle du pH

Durant la période ischémique, le pH intracellulaire s'est modifié, il est devenu plus acide du fait du métabolisme anaérobie. La reperfusion permet une correction rapide du pH grâce à l'échangeur Na^+/H^+ . Cependant, cette variation brutale du pH est délétère pour les cardiomyocytes. Ainsi une réoxygénation en l'absence d'augmentation brutale du pH limite la mort cellulaire (182). Cette mort cellulaire induite par l'augmentation de pH serait médiée par le mitoPTP (183).

2.1.3. Inflammation

Lors de la reperfusion, le tissu ischémié relargue de nombreux chemoattractants qui vont conduire au recrutement des neutrophiles sur le site ischémié. Ce phénomène est relativement précoce puisqu'il survient dans les 6 heures suivant l'ischémie (184). Les neutrophiles ainsi recrutés sont à l'origine de la libération de protéases, d'espèces réactives l'oxygène et favorisant l'agrégation plaquettaire. Le rôle majeur de l'inflammation dans la formation des lésions d'ischémie reperfusion a été démontré expérimentalement dans des expériences d'inhibition de diverses étapes du recrutement des neutrophiles qui permettent de diminuer la taille de l'infarctus de plus de 50% (185-187). Les études cliniques ont toutefois conduit à des résultats plus mitigés puisque la plupart des thérapeutiques testés (anticorps anti-CD18, anti-CD11, anti C5 du complément, antagoniste des P-selectin) ne permettent pas d'obtenir un effet cardioprotecteur majeur (188 , 189 , 190 , 191), en dehors peut-être de l'adénosine qui a montré des résultats positifs mais limités aux patients pris en charge précocement dans les 3 heures (192 , 193).

2.1.4. Pore de transition de perméabilité mitochondriale (mitoPTP)

Le mitoPTP est un canal non sélectif de la membrane interne de la mitochondrie. En condition physiologique normale, la membrane interne de la mitochondrie est imperméable aux ions permettant le maintien d'un gradient de protons indispensable à la production d'ATP. Le mitoPTP est donc fermé. Lors de la reperfusion, sous l'effet du stress oxydant et du pic intracellulaire de calcium, le mitoPTP s'ouvre (183 , 194). Cette ouverture entraîne un relargage dans le cytosol de facteurs proapoptotiques et découple la phosphorylation oxydative provoquant une déplétion en ATP. L'ouverture du mitoPTP est donc à l'origine d'une mort cellulaire. Le mitoPTP est donc un facteur majeur de la régulation de la mort cellulaire durant la reperfusion (195).

2.2. Conséquences

2.2.1. Sidération myocardique

La sidération myocardique est définie comme une dysfonction mécanique qui persiste après la reperfusion malgré l'absence de lésions irréversibles et malgré la restauration d'un flux coronaire normal (196). Elle disparaît normalement dans les heures ou les jours qui suivent la reperfusion. La surcharge calcique semble jouer un rôle important dans le phénomène de sidération myocardique (197).

2.2.2. Phénomène de no-reflow

Ce phénomène est défini par l'impossibilité de reperfuser une partie du territoire ischémié malgré une revascularisation complète (198). En effet dans la majorité des modèles expérimentaux, la reperfusion ne restaure que partiellement le débit sanguin du territoire ischémié. Ce phénomène serait dû à une dysfonction endothéliale secondaire à la reperfusion et à l'occlusion par activation plaquettaire (199).

2.2.3. Arythmies de reperfusion

Les arythmies de reperfusion sont responsables de mort subite au cours de la revascularisation. De nombreux traitements sont actuellement disponibles pour prendre en charge ces arythmies. Il ne semble pas en revanche que celles-ci influent sur la taille de la zone infarctée (200). La surcharge calcique, les modifications de l'homéostasie potassique, et le stress oxydant sont à l'origine de ces arythmies (201).

2.2.4. Lésions létales de reperfusion

Les lésions létales de reperfusion correspondent aux lésions irréversibles du myocarde distinctes de celles dues à l'ischémie. Ce concept de lésions uniquement due à la reperfusion a longtemps été débattu. Certains ont en effet suggéré que la reperfusion ne faisait qu'exacerber

les dégâts provoqué par l'ischémie (202). La découverte du phénomène de post-conditionnement, permettant, grâce à une intervention appliquée au début de la reperfusion, donc après l'ischémie, de diminuer la taille de l'infarctus, a permis d'appuyer l'existence d'un véritable effet délétère propre à la reperfusion (184).

3. POSTCONDITIONNEMENT CARDIAQUE

Le préconditionnement, connu depuis 1986 et consistant à appliquer avant l'ischémie, soit des cycles brefs et répétés d'ischémie-reperfusion, soit un traitement pharmacologique, avait montré sa capacité à diminuer la taille de l'infarctus après une IR (203). Cependant la nécessité d'appliquer le traitement avant l'ischémie ne correspondait pas à la pratique clinique de prise en charge des infarctus en phase aigue. En 2003, Zhao et al. ont décrit le phénomène de post-conditionnement (PostC) (204). Dans cette étude princeps, ils ont montré que de brefs épisodes d'IR appliqués juste après la reperfusion (PostC ischémique) permettaient de diminuer la taille de l'infarctus de 47 à 11% chez des chiens soumis à une ischémie de 45 min. De nombreux autres travaux expérimentaux ont ensuite permis de mieux caractériser les modalités du protocole de PostC. Il a ainsi été montré que le PostC n'était efficace que si appliqué dans les 10 min suivant la reperfusion. Les protocoles dépendent également de l'espèce utilisée et du temps d'ischémie (205). Il a également été montré que, comme pour le préconditionnement, un traitement pharmacologique appliqué au moment de la reperfusion était capable de diminuer la taille de l'infarctus (PostC pharmacologique) (184). Cette approche pharmacologique a ainsi permis de mettre en évidence les médiateurs et les voies de signalisation impliqués dans le mécanisme de PostC (Figure 8).

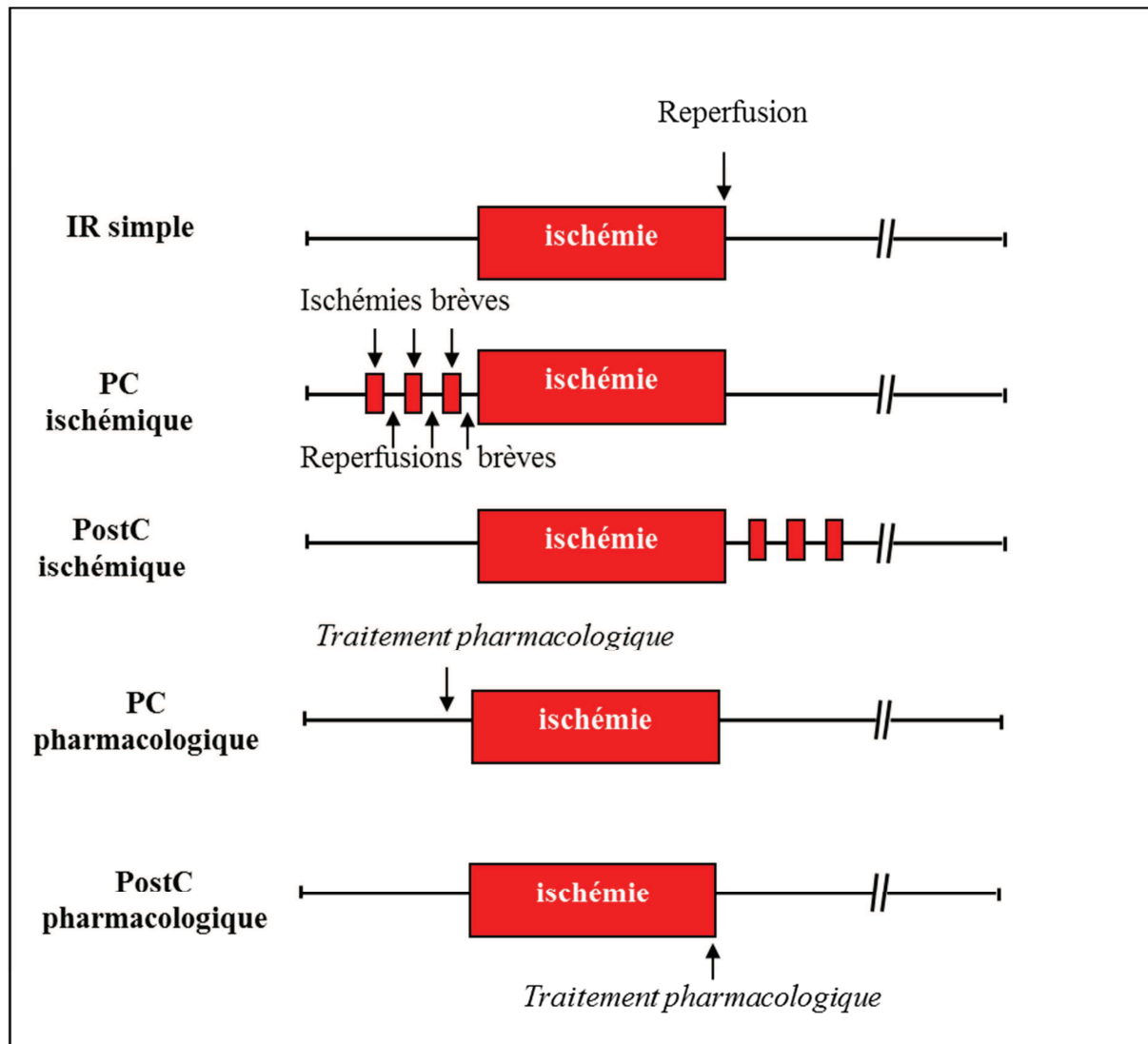


Figure 7 : Protocoles de cardioprotection par préconditionnement (PC) ou postconditionnement (PostC). La taille de l'infarctus mesurée in vivo chez l'animal, après une occlusion coronaire (IR simple) peut être considérablement réduite par une ou plusieurs séquences brèves d'ischémie-reperfusion appliquées soit avant l'ischémie longue (Préconditionnement ischémique, PC ischémique), soit au moment de la reperfusion (Postconditionnement ischémique, PostC ischémique). Le bénéfice de cette intervention peut aussi être reproduit par une intervention thérapeutique qui précède ou fait suite à l'occlusion coronaire : on parle de Préconditionnement pharmacologique (PC pharmacologique) ou de Postconditionnement pharmacologique (PostC pharmacologique) respectivement.

Les mécanismes du PostC ne sont pas complétement éclaircis mais le rôle majeur de la voie RISK (Reperfusion Injury Salvage Kinase) et du mitoPTP émerge de plus en plus actuellement. La voie RISK correspond à un groupe de protéines kinases qui sont activées lors d'un PostC ischémique et dont l'activation pharmacologique protège le cœur de l'IR. La voie RISK se compose de la voie MAPK (ERK1/2) et de la voie PI3-kinase/Akt. L'activation de ces voies permet d'améliorer la recapture du calcium par le réticulum sarcoplasmique (206), de diminuer les signaux pro-apoptotiques et surtout d'inhiber l'ouverture du mitoPTP par inhibition de GSK-3 β (207). En effet, il semble que l'ouverture du mitoPTP soit une étape clé des lésions d'IR. L'ensemble des voies de signalisations cardioprotectrices mis en jeu lors du postconditionnement convergent vers l'inhibition du mitoPTP via la phosphorylation inhibitrice de GSK-3 β . Ainsi, l'inhibition pharmacologique de l'ouverture du mitoPTP notamment par la cyclosporine A permet de diminuer la taille de l'infarctus dans de nombreux modèles expérimentaux. Ce traitement a également prouvé son efficacité chez l'homme puisqu'il permet une diminution de la taille de l'infarctus, corrélé à une amélioration de la fonction cardiaque (208 , 209). Plusieurs médiateurs activant la voie RISK ont été identifiés, notamment des ligands de récepteurs couplés aux protéines G dont la bradykinine (Figure 9).

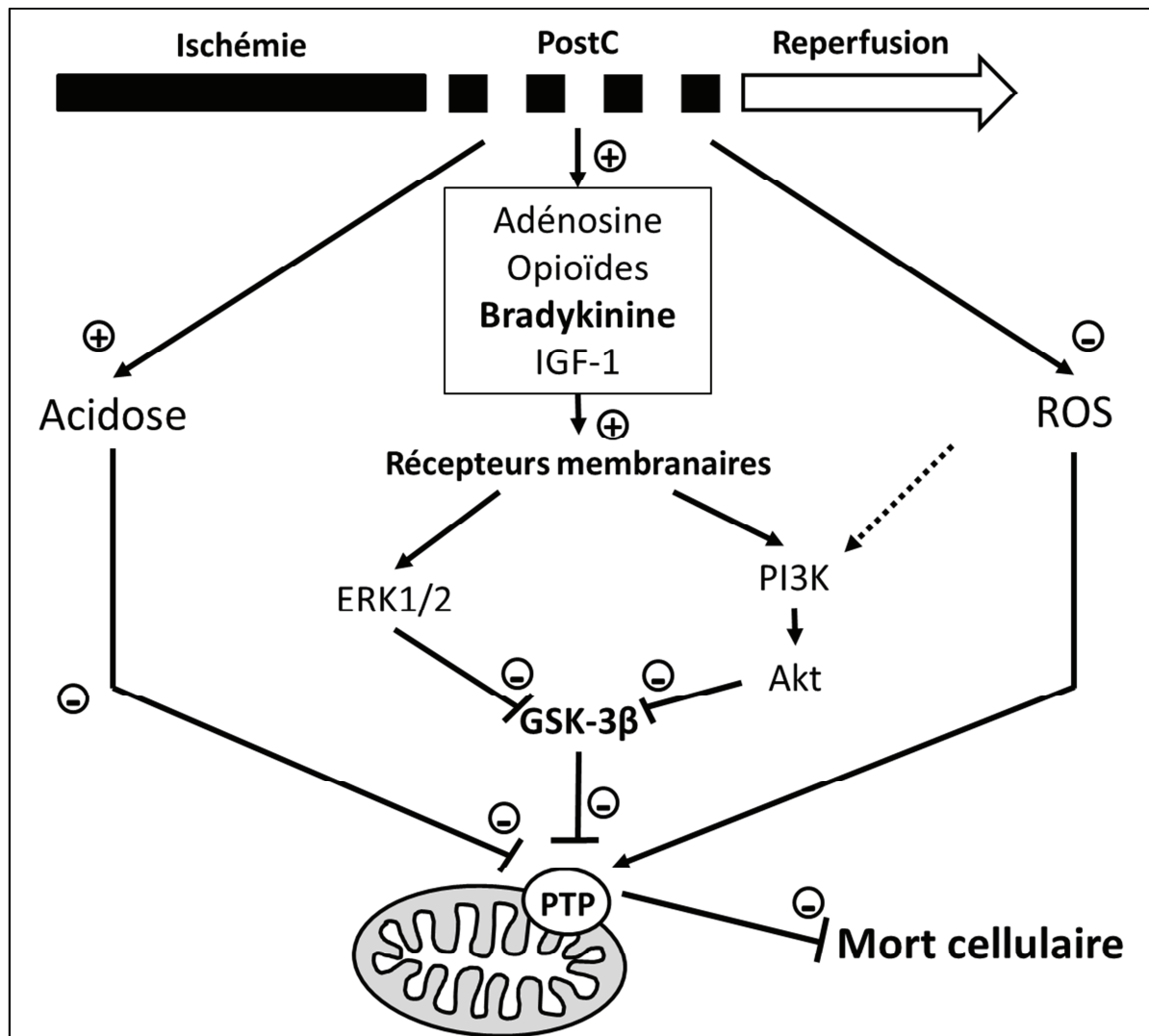


Figure 8: Voies de signalisation intracellulaire impliquées dans le PostC. Le PostC active, via différents médiateurs, la voie RISK (ERK1/2, PI3K/Akt) qui conduit à l'inhibition de GSK-3 β empêchant ainsi l'ouverture du mitoPTP (PTP) et diminuant la mort cellulaire. Le PostC va également diminuer la correction trop brutale de l'acidose secondaire à l'ischémie et diminuer la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

3.1. Post-conditionnement cardiaque et diabète

Les données expérimentales actuellement disponibles concernant l'effet de l'hyperglycémie sur les lésions d'IR sont contradictoires. En effet, certaines études mettent en évidence une diminution de la taille de l'infarctus myocardique dans des modèles murins hyperglycémiques (210 , 211) alors que d'autres montrent une aggravation des lésions d'IR lors du diabète (212 , 213) ou bien l'absence de différence de taille d'infarctus entre les animaux diabétiques et non diabétiques (214 , 215). Les mécanismes à l'origine de ces différences sont peu clairs (216). Il existe en effet de nombreuses différences entre les protocoles expérimentaux (modèle de diabète, niveau d'insuline, espèce et souche utilisées, durée d'exposition à l'hyperglycémie, durée d'ischémie,...). Même si un seul facteur explicatif ne peut être dégagé, il semble que la durée d'exposition à l'hyperglycémie et le niveau d'insulinémie peuvent influencer la réponse à l'IR. En effet, une durée d'exposition courte à l'hyperglycémie serait protectrice alors que les lésions seraient plus importantes après une exposition plus prolongée (217). Ces résultats pourraient être liés à la réponse cellulaire initiale à l'hyperglycémie entraînant une augmentation de la synthèse de eNOS, de l'activation d'Akt, de la PKC, de ERK1/2 et de la réduction de la surcharge calcique (210 , 215). Cependant ces résultats ne sont pas constants et d'autres études retrouvent une augmentation de la taille de l'infarctus après seulement 8 jours de diabète (218 , 219). De plus de nombreuses études mettent en évidence l'absence d'effet du diabète sur la taille de l'infarctus (216). Chez l'homme, les quelques données disponibles sont faveur d'une plus grande susceptibilité aux lésions d'IR en cas de diabète. En effet, après reperfusion, la taille de la zone nécrosée déterminée par imagerie nucléaire, est plus importante chez les diabétiques comparés au non diabétiques (220 , 221). Cette susceptibilité accrue aux lésions d'IR pourrait expliquer la plus grande morbidité à court et long terme observé chez les patients diabétiques après syndrome coronarien aigu (222).

Si l'effet du diabète sur la susceptibilité aux lésions d'IR n'est pas certaine, son impact négatif sur la réponse aux mécanismes cardioprotecteurs et notamment le PostC est bien démontré. En effet, la plupart des études expérimentales montrent une diminution ou une perte de l'effet cardioprotecteur du PostC dans différents modèles de diabète ou d'hyperglycémie (214, 223-225). Cette résistance au PostC induite par le diabète est liée à une diminution ou un blocage de l'activation des voies de signalisation cardioprotectrices (voie RISK notamment). En effet, la phosphorylation activatrice de ces voies est abolie lorsqu'un PostC ischémique ou pharmacologique est appliqué à des modèles de diabète (214, 226-228). De plus, il semble que le taux de GSK-3 β active dans les mitochondries soit augmenté en cas de diabète, conduisant à une augmentation du seuil d'inhibition du mitoPTP (229).

Les mécanismes à l'origine de cette résistance ne sont pas encore bien compris. Il semble que l'hyperglycémie en soi en est la cause puisque une hyperglycémie aiguë par perfusion de dextrose entraîne les mêmes conséquences de blocage de la cardioprotection. De même, la correction de l'hyperglycémie par transplantation d'îlots pancréatiques dans un modèle de diabète de type 1 induit par streptozotocine, permet de restaurer l'effet du PostC (230). L'action inhibitrice de l'hyperglycémie sur les signaux cardioprotecteurs implique le stress du réticulum endoplasmique. En effet, dans un modèle de rats diabétiques et obèses (rats OLETF), Miki et al. ont montré que l'inhibition de GSK-3 β via la voie MAP-Kinase était abolie par un mécanisme dépendant du stress du réticulum endoplasmique (229).

Alors que le diabète est une source majeure de pathologie cardiaque ischémique, les traitements cardioprotecteurs sont inefficaces du fait d'une résistance au PostC induite par l'hyperglycémie. La compréhension des mécanismes à l'origine de cette résistance et l'identification de nouvelles cibles pharmacologiques, notamment les récepteurs des kinines, sont nécessaires pour améliorer le pronostic cardiovasculaire des patients diabétiques.

3.2. Système kallicroïne-kinines et postconditionnement

L'activation des voies de signalisation cardioprotectrices lors des manœuvres de PostC ischémique met en jeu plusieurs médiateurs (Figure 11). Parmi ceux-ci, les kinines et ses récepteurs jouent un rôle important. En effet, le taux de BK augmente lors d'un préconditionnement ischémique (231). De plus, il existe de nombreux arguments expérimentaux impliquant de façon positive le SKK dans les mécanismes de conditionnement cardiaque. Il a ainsi été montré que l'administration de BK au moment de la reperfusion permettait de limiter la taille de l'infarctus (232, 233). De même, l'inactivation génétique du SKK s'accompagne d'une perte de l'effet protecteur du PC ischémique chez des souris déficientes en TK (234). L'action protectrice du SKK sur l'IR semble liée à l'action du B2R. En effet, l'effet des IEC est aboli par l'inhibition pharmacologique du récepteur B2 (234-236). De plus, l'effet protecteur du PostC ischémique est perdu chez des souris déficientes en B2R (237). L'ensemble de ces données mettent en évidence un rôle majeur du B2R dans les mécanismes de PostC.

En revanche, le rôle du B1R est moins clair. Il n'existe pas de données spécifiques sur le rôle du B1R dans le PostC. Les données disponibles sur le rôle du B1R dans l'IR et le préconditionnement sont contradictoires. En 1993, Chahine et al. ont montré que la BK diminuait la fibrillation ventriculaire après IR et que cet effet était lié à l'activation du B1R et pas du B2R (238). Inversement, la taille de l'infarctus est diminuée chez des souris KO pour le B1R ou lorsque le B1R est inhibé pharmacologiquement chez des rats après IR (234, 239). De même, alors que la BK injectée après l'ischémie diminue la taille de l'infarctus, la des-Arg⁹-BK (agoniste naturel du B1R) n'a pas d'effet (240). Le rôle du B1R reste donc à préciser même s'il semble que son effet soit plutôt délétère lors de l'IR.

Le but de nos travaux a donc été d'étudier l'effet de l'activation directe des récepteurs B1 et B2 des kinines sur les lésions d'IR cardiaque chez la souris diabétique et la souris non diabétique. A côté de leur aspect cognitif pour déterminer le rôle respectif de chaque récepteur et les voies de signalisation impliquées, nos travaux ont eu pour objectif de d'évaluer si le SKK pouvait constituer une cible potentielle pour la prise en charge des lésions d'IR.

4. AGONISTES DES RECEPTEURS DES KININES

La plupart des données expérimentales sur le rôle du SKK dans l'IR sont obtenues par l'utilisation de modèles d'inactivation génétique et pharmacologique ou des modèles de stimulation du système non spécifique de chaque récepteur. On a vu que l'utilisation des modèles d'inactivation génétique d'un récepteur ne permet pas de s'affranchir de l'effet de la compensation régulatrice de l'autre récepteur. L'ensemble des données est en faveur d'un rôle bénéfique de la stimulation du SKK lors de l'IR même si le rôle du B1R reste à préciser. L'utilisation des ligands naturels du B1R et B2R (BK et des-Arg9-BK respectivement) pour activer les potentiels processus cardioprotecteurs, est limitée par la grande labilité de ces ligands, dont la demi-vie est extrêmement courte du fait de la dégradation enzymatique rapide lors du passage pulmonaire notamment par l'ECA et la clairance rénale rapide.

Le développement d'agonistes puissants, sélectifs, résistant à la dégradation protéasique et actifs sur les récepteurs humains offre donc des outils pharmacologiques pour mieux définir le rôle de chaque récepteur dans diverses situations pathologiques expérimentales et également un potentiel traitement clinique.

L'équipe du Pr Fernand Gobeil Jr. à l'Université de Sherbrooke, en modifiant la séquence de la des-Arg9-BK et de la BK, a récemment développé deux peptides de synthèse actifs sur le B1R et le B2R respectivement (241 , 242) (Tableau 2, Figures 10 et 11).

Agonistes	Séquence peptidique
B2R	[Hyp(3),Thi(5),(N)Chg(7),Thi(8)]-bradykinin
B1R	SarLys[Hyp3, Igl5, DPhe8]desArg9-bradykinin

Tableau 2: séquence peptidique des agonistes utilisés

L'activité de ces agonistes a été étudiée à la fois in vitro sur des cordons ombilicaux humains isolés, sur des cellules transfectées avec les récepteurs humains et in vivo sur des lapins et des rats. Ces expériences ont permis de mettre en évidence une activité pharmacologique plus importante en comparaison avec les agonistes naturels. De plus, la spécificité des agonistes a été testée par des études de liaison compétitive avec radioligand sur cellules transfectées et a permis de montrer une importante spécificité de chaque agoniste pour son récepteur.

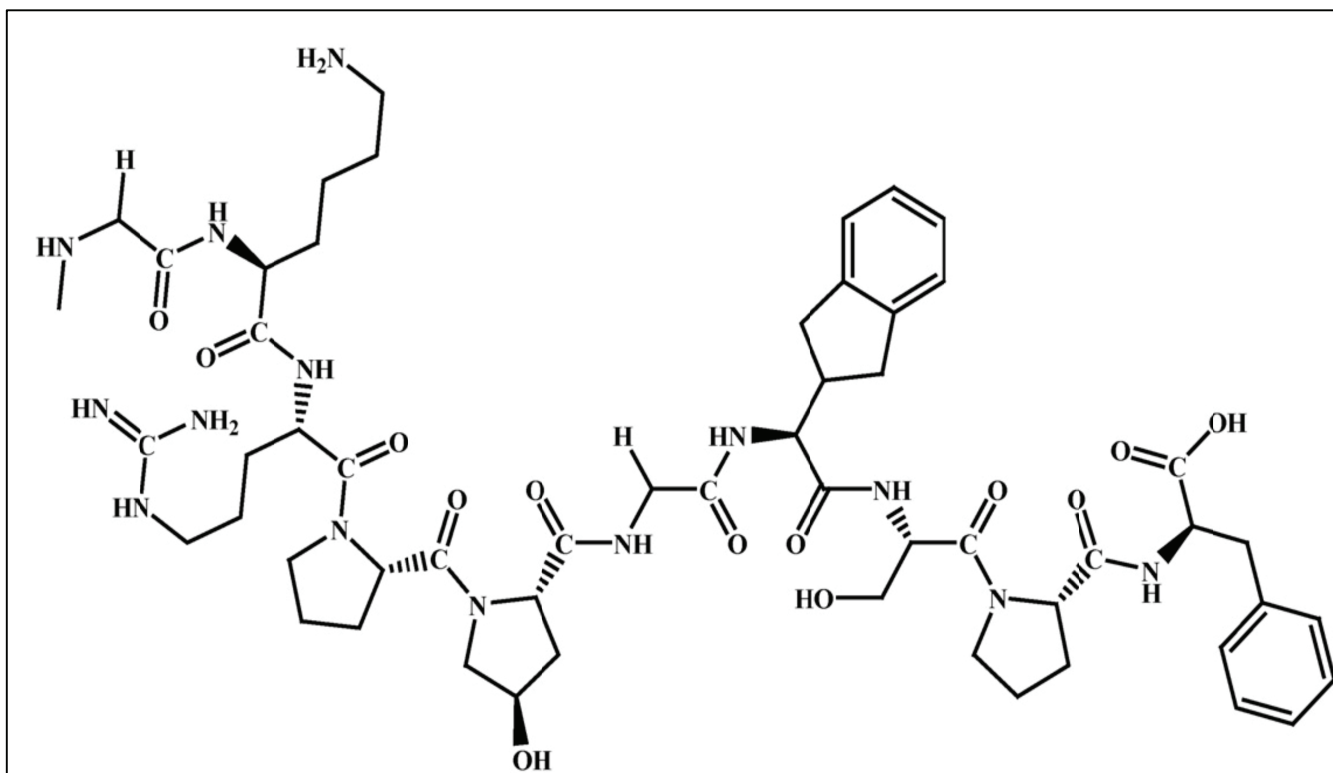


Figure 9 : Structure en 2 dimensions de l'agoniste peptidique du B1R

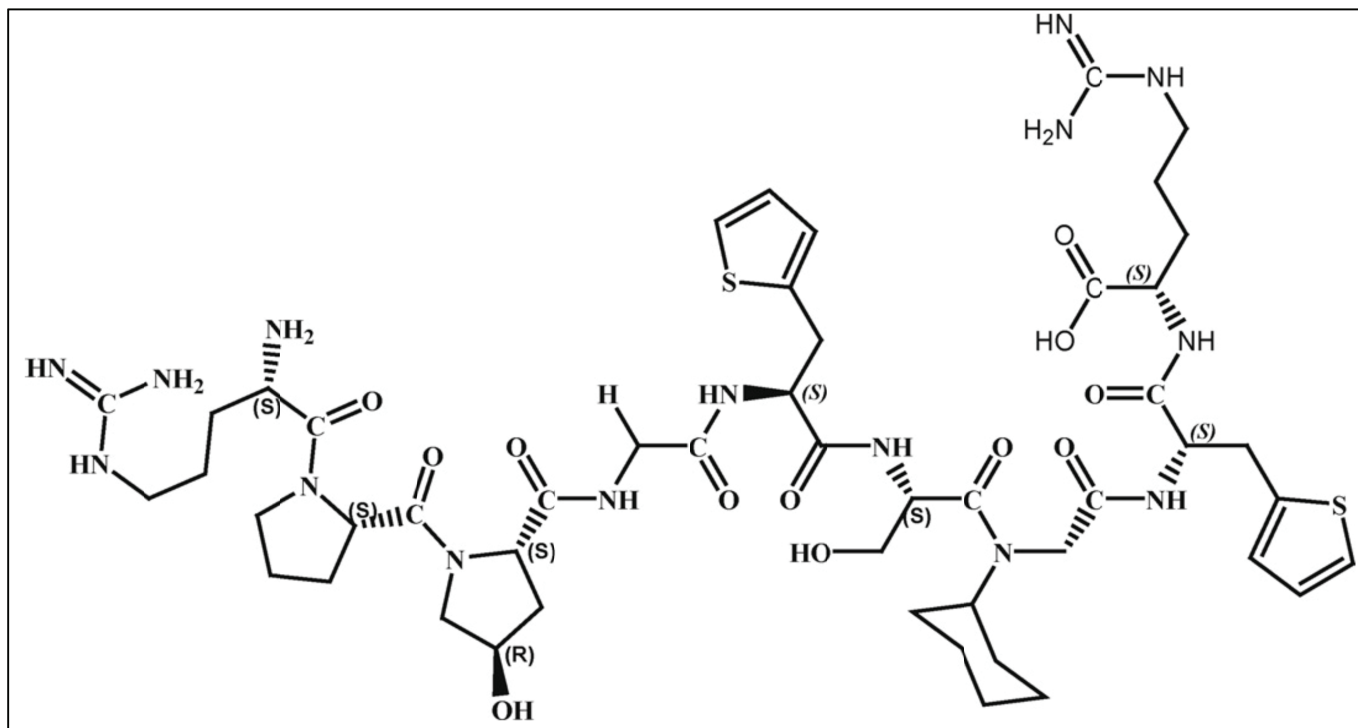


Figure 10 : Structure en 2 dimensions de l'agoniste peptidique du B2R

4.1. Effet des agonistes sur la pression artérielle

Afin de confirmer les résultats obtenus par l'équipe du Pr Gobeil dans nos modèles murins et de choisir la dose adéquate à la réalisation de notre étude, des expériences préliminaires sur l'effet tensionnel aigu de l'injection intraveineuse des agonistes ont été réalisées.

4.1.1. Matériels et méthodes

Des souris mâles de 10 semaines, de souche C57BL/6 (20-25 g) ont été utilisées pour l'ensemble des expériences (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France). Le diabète a été induit par 5 injections intrapéritonéales de streptozotocine (50 µg/kg de poids dilué dans 0,05 mol/l de citrate de sodium, pH 4,5). Les expériences ont été réalisées 5 semaines après la première injection de streptozotocine chez les souris présentant un diabète établi (glycémie à jeun ≥ 250 mg/dL). Un groupe témoin a été réalisé par injection de tampon seul. Afin de tester l'effet tensionnel de l'agoniste B1R, des souris ont été traitées par LPS afin d'induire l'expression du B1R (injection intrapéritonéale de LPS à 10 mg/kg la veille de la mesure de la pression artérielle). Toutes les souris ont été maintenues dans un cycle jour/nuit de 12h et avaient un accès non restreint à l'eau et la nourriture standard.

Les souris ont été anesthésiées par une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (60 mg/kg). Après réalisation d'une trachéotomie, un cathéter a été inséré dans la carotide gauche pour mesure continue de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque (MP100, Biopacsystems; Cerom, Paris, France). L'effet tensionnel de doses croissantes d'agonistes B1R et B2R a été testé, de 0,01 à 10 nmol/kg pour l'agoniste de B2R et de 0,01 à 100 nmol/kg pour l'agoniste de B1R (1 µl/g de poids corporel injecté en bolus à 5-10 min d'intervalle dans la veine jugulaire droite). L'effet de la BK aux mêmes doses a également été testé pour comparaison. L'effet spécifique de l'agoniste B2R a été contrôlé par injection d'un

antagoniste du B2R (Icatibant, HOE140, 500 µg/kg), 5 min avant l'injection de l'agoniste B2R. La pression artérielle moyenne a été calculé selon la formule : $((2 \times \text{pression artérielle diastolique}) + \text{pression artérielle systolique})/3$.

4.1.2. Résultats

L'agoniste B2R [Hyp(3),Thi(5),(N)Chg(7),Thi(8)]-bradykinine diminue la pression artérielle de façon dose-dépendante (Figure 12). Cet effet hypotenseur est totalement bloqué par l'administration préalable d'Icatibant, un antagoniste du B2R. De façon concomitante à la diminution de la pression artérielle, on observe pour des doses égales ou supérieures à 1 nmol/kg une tachycardie. La dose de 10 nmol/kg s'accompagne d'une baisse majeure de la pression artérielle et d'une tachycardie importante conduisant au décès de la souris. L'effet de l'agoniste B2R est similaire chez la souris diabétique et non diabétique (Figure 13). La baisse de la pression induite par l'agoniste B2R est significativement plus importante que celle induite par la BK aux mêmes doses (Figure 14). De plus, la durée de l'effet sur la pression artérielle est plus importante que celui de la BK (Figure 15).

L'agoniste B1R SarLys[Hyp3, Igl5, DPhe8]desArg9-bradykinine n'a aucun effet sur la pression artérielle ou la fréquence cardiaque même aux doses maximales testées. Cette absence d'effet s'observe dans tous les modèles testés, non diabétique, diabétique et LPS.

Au vu de l'ensemble de ces résultats, des doses de 1 et 3 nmol/kg pour l'agoniste B1 et des doses de 0,01 et 0,1 nmol/kg, subhypotensives et n'induisant pas de tachycardie, pour l'agoniste B2R, ont été choisies pour les expériences décrites ci-après.

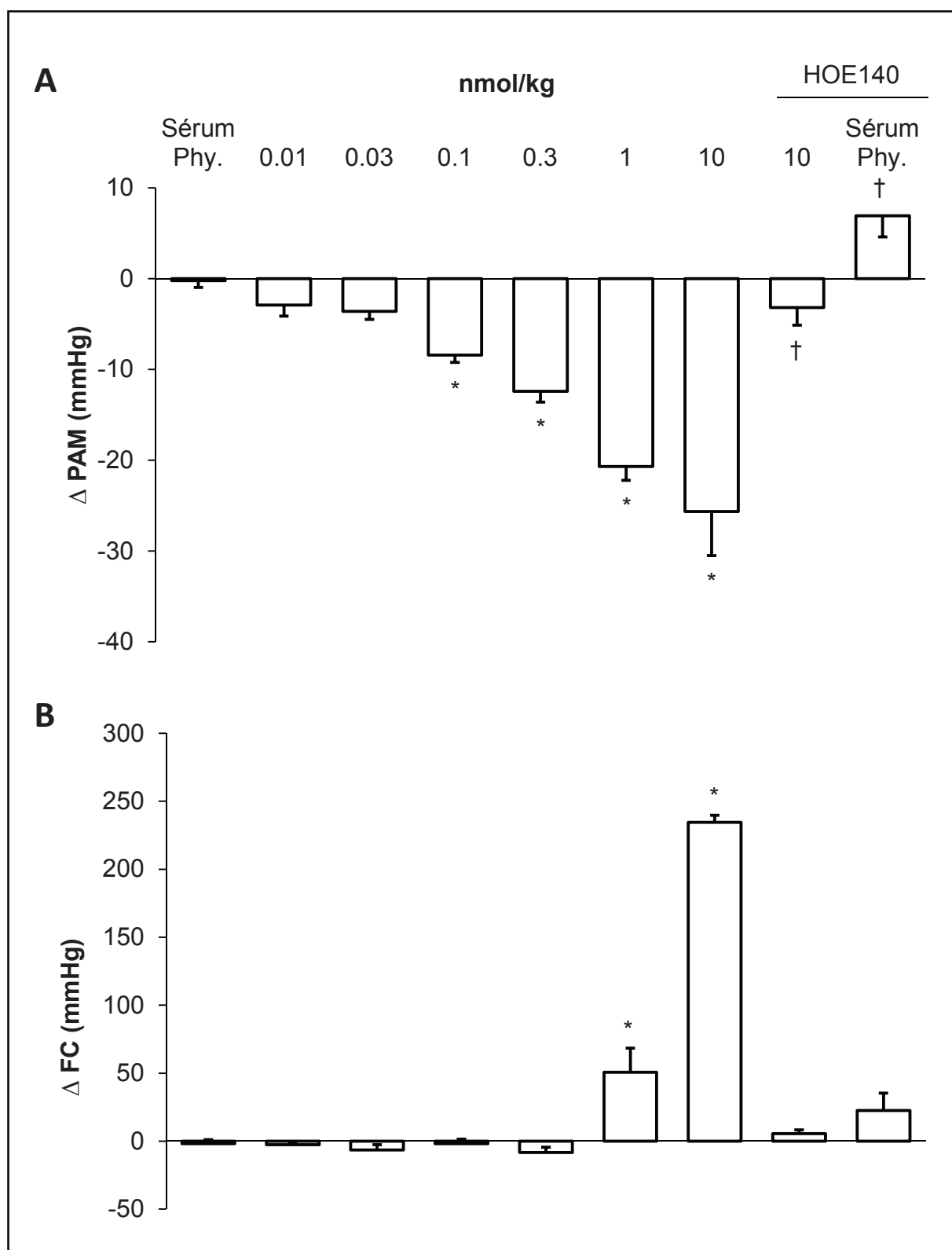


Figure 11 : effet sur la pression artérielle moyenne (PAM) (A) et la fréquence cardiaque (FC) (B) de l'injection *iv* de l'agoniste B2R. * $p < 0.05$ vs. Sérum physiologique (Sérum phy.), † $p < 0.05$ vs. dose de 10 nmol/kg

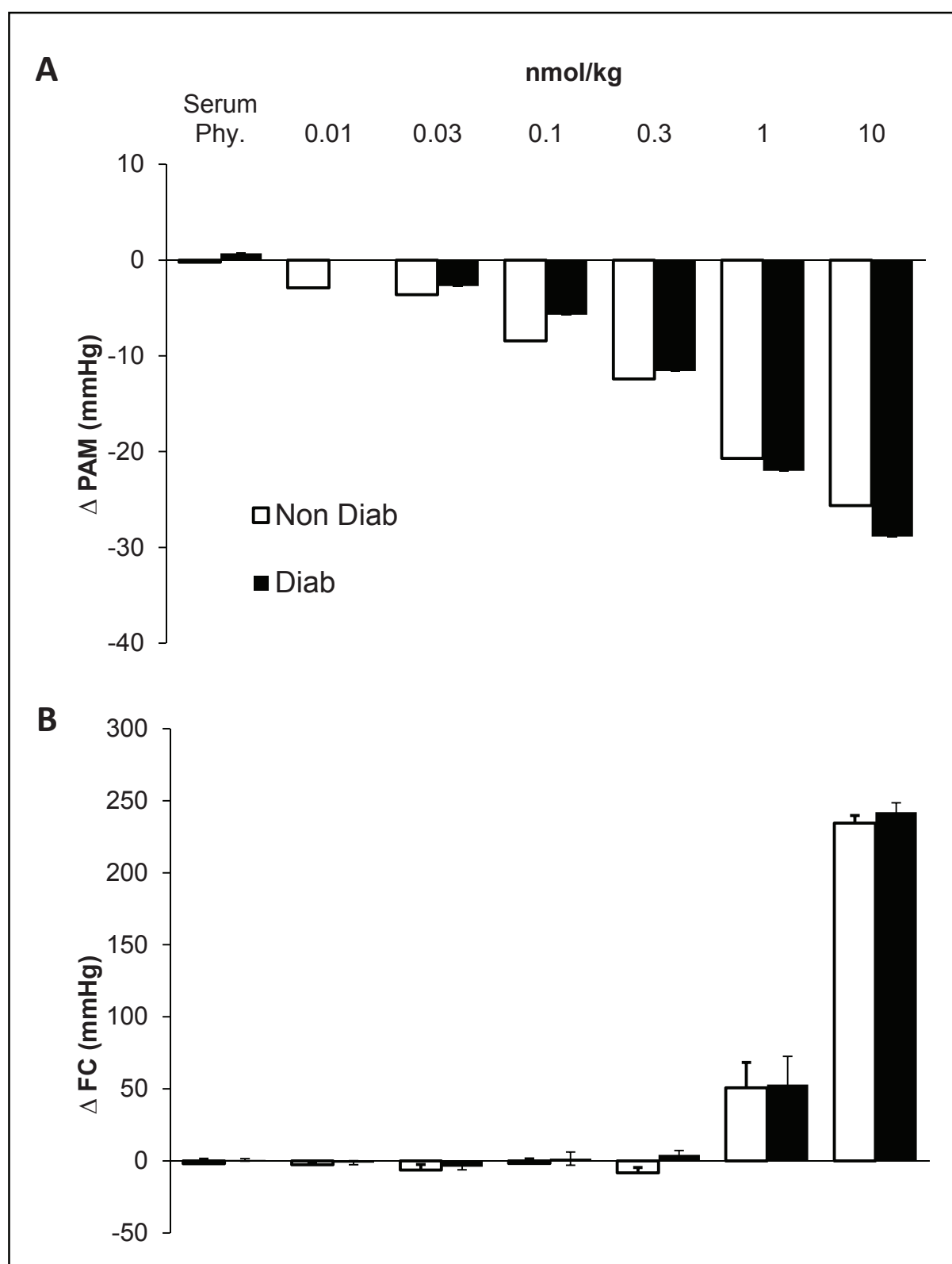


Figure 12 : effet de l'agoniste B2R sur la pression artérielle moyenne (PAM) (A) et sur la fréquence cardiaque (FC) (B) chez les souris non diabétiques (barres blanches) et diabétiques (barres noires).

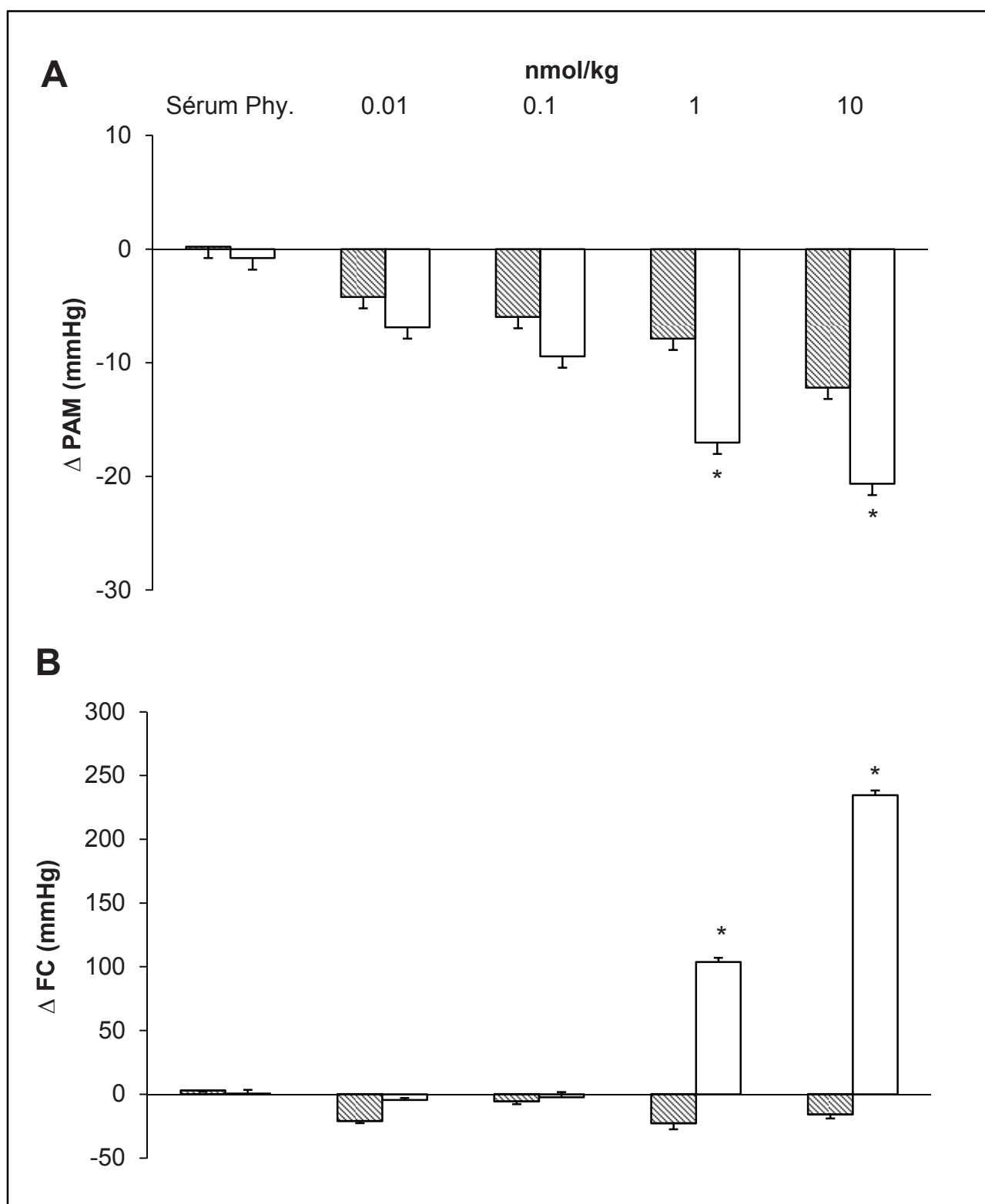


Figure 13 : effet sur la pression artérielle moyenne (PAM) et la fréquence cardiaque (FC) de l'injection *iv* de l'agoniste B2R Ag B2R (barres grises) et de la bradykinine (BK) (barres blanches). * $p < 0.05$ vs. BK à la même dose.

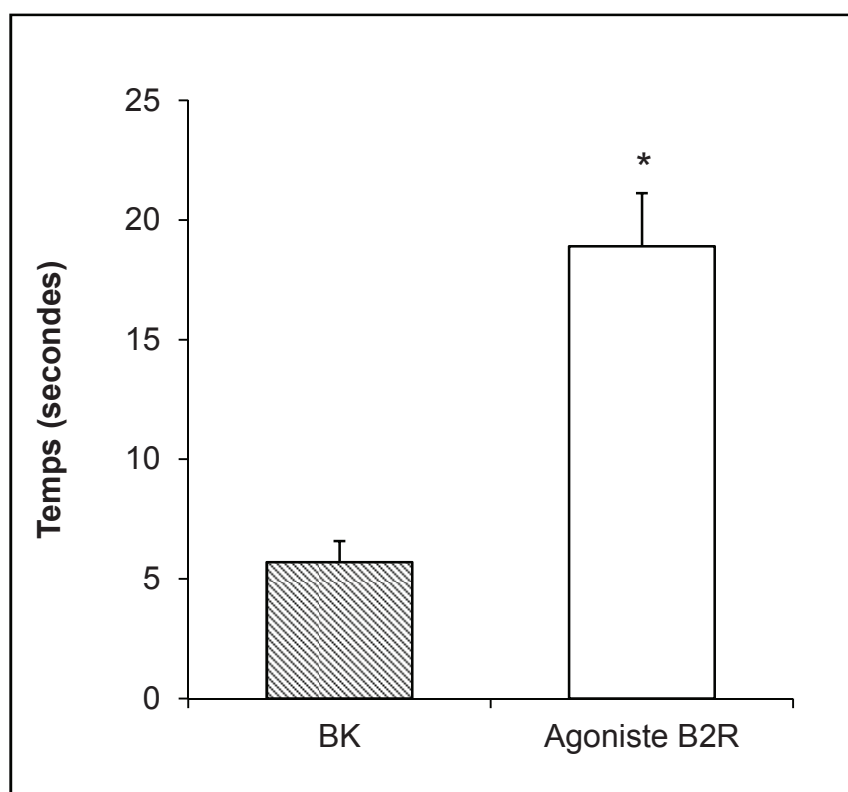


Figure 14: durée d'action de l'effet tensionnel de l'agoniste B2R (barre blanche) et de la bradykinine (BK, barre grise). La durée d'action est définie comme le temps entre l'injection de l'agoniste et le retour à la valeur basale de la pression artérielle. Elle a été mesurée pour la dose de 1 nmol/kg. *p<0.05 vs. Bradykinine.

**5. ARTICLE: SELECTIVE KININ RECEPTOR AGONISTS AS
CARDIOPROTECTIVE AGENTS IN MYOCARDIAL
ISCHEMIA AND DIABETES**

Selective Kinin Receptor Agonists as Cardioprotective Agents in Myocardial Ischemia and Diabetes

Louis Potier, Ludovic Waeckel, Marie-Pascale Vincent, Catherine Chollet, Fernand Gobeil Jr, Michel Marre, Patrick Bruneval, Christine Richer, Ronan Roussel, François Alhenc-Gelas, and Nadine Bouby

INSERM U872, Research Center les Cordeliers, Paris, France (L.P., L.W., M.-P.V., C.C., C.R., R.R., F.A.-G., N.B.); Pierre et Marie Curie University, Paris, France (L.P., L.W., M.-P.V., C.C., C.R., R.R., F.A.-G., N.B.); Paris Descartes University, Paris, France (L.P., L.W., M.-P.V., C.C., C.R., R.R., F.A.-G., N.B.); Diabetology, Endocrinology, and Nutrition Department, AP-HP, Bichat-Claude Bernard Hospital, Paris, France (L.P., M.M., R.R.); Department of Pharmacology, Sherbrooke University, Sherbrooke, Quebec, Canada (F.G.); Paris Diderot University, Paris, France (M.M., R.R.); INSERM U695, Paris, France (M.M., R.R.); Department of Pathology, Georges Pompidou European Hospital, Paris, France (P.B.)

Received February 7, 2013; accepted April 13, 2013

ABSTRACT

Cardiac ischemia is a leading cause of death, especially in diabetic patients. The diabetic ischemic heart is resistant experimentally to established cardioprotective treatments. New pharmacological approaches to cardiac protection are warranted. The kallikrein-kinin system is involved in myocardial protection in ischemia. Respective roles of B1 (B1R) and B2 (B2R) receptors remain controversial. We tested whether pharmacological activation of kinin receptors may have therapeutic effect in cardiac ischemia-reperfusion in nondiabetic (NDiab) and diabetic (Diab) mice. We assessed effect on infarct size (IS) and signaling pathways involved in myocardial protection of potent selective pharmacological agonists of B1R or B2R given at reperfusion. In NDiab mice, a B2R agonist reduced IS significantly by 47%, similarly to ramiprilat or ischemic postconditioning, via activation of phosphoinositide 3 kinase/Akt

pathway leading to inhibition of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β). B1R agonist had no effect on IS. In contrast, in Diab mice, the B2R agonist, ramiprilat, or ischemic postconditioning failed to reduce IS but a B1R agonist significantly reduced IS by 44% via activation of phosphoinositide 3 kinase/Akt and extracellular signal-regulated kinase 1/2, both leading to GSK-3 β inhibition. Differential effect of B2R or B1R agonists in NDiab and Diab mice can be linked to inactivation of B2R signaling and induction of B1R in heart of Diab mice. Thus, a pharmacological B2R agonist is cardioprotective in acute ischemia in nondiabetic animals. B1R agonist overcomes resistance of diabetic heart to cardioprotective treatments. Pharmacological activation of B1R and B2R may become a treatment for diabetic and nondiabetic patients, respectively, in acute coronary syndromes.

Introduction

Coronary heart disease is a leading cause of death worldwide and coronary occlusion is a major complication of coronary heart disease, leading to ischemia, myocardial infarction, heart failure, arrhythmia, and death (White and Chew, 2008). Diabetes is currently one of the main causes of coronary heart disease, while early and late prognosis of myocardial infarction is dramatically worsened in diabetes, so that coronary heart disease accounts for up to 50% of premature deaths in diabetic populations (Kannel and McGee, 1979; Danaei et al., 2006;

Donahoe et al., 2007). The poor prognosis of coronary heart disease in patients with diabetes is unlikely to be improved solely by improvement of glycemic control, since intensive glycemic control failed to reduce cardiovascular events and mortality rate in recent clinical trials (Patel et al., 2008; Duckworth et al., 2009). Early myocardial reperfusion remains the most effective therapy for limiting infarct size (IS) after coronary occlusion. However, restoring blood flow to the ischemic myocardium can result in myocardial injury and partly offset the beneficial effect of reperfusion (Yellon and Hausenloy, 2007). Experimental maneuvers such as ischemic pre- or postconditioning or administration after coronary occlusion of several bioactive substances or pharmacological agents can reduce myocardial ischemia-reperfusion (IR) injury in nondiabetic animals and in man (Zhao et al., 2003; Piot et al., 2008; Gerczuk and Kloner, 2012). However, diabetes is known

This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; Paris Descartes and Pierre et Marie Curie Universities; the National Research Agency; and the Société Francophone du Diabète.

dx.doi.org/10.1124/jpet.113.203927.

ABBREVIATIONS: ACE, angiotensin I-converting enzyme; AR, area at risk; B1R, B1 receptor; B2R, B2 receptor; Diab, diabetic; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2; GSK-3 β , glycogen synthase kinase-3 β ; HOE140, D-Arg-[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]bradykinin; IPostC, ischemic postconditioning; IR, ischemia-reperfusion; IS, infarct size; LV, left ventricle; MAP, mean arterial pressure; NDiab, nondiabetic; RISK, reperfusion ischemia salvage kinase; SSR240612, (2R)-2-[(3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[(6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl]amino]-3-(4-[[2R,6S)-2,6-dimethylpiperidinyl]methyl]phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamide hydrochloride; TTC, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride.

to impair response of the myocardium to cardioprotective interventions. In diabetic animals the myocardium is resistant to the cardioprotective effect of ischemic or pharmacological pre- and postconditioning (Gross et al., 2007; Bouhidel et al., 2008; Miki et al., 2009; Ovize et al., 2010; Zhu et al., 2012). In humans, the IS-reducing effect associated with prodromal angina was not observed in patients with diabetes, suggesting that diabetes prevents ischemic preconditioning (Ishihara et al., 2001). Novel approaches for protecting and salvaging the ischemic myocardium, especially in the setting of diabetes are needed and can lead to significant improvement in prognosis of coronary heart disease.

Kinins are potent vascular endothelium activators and trigger release of a number of endothelial mediators promoting smooth muscle relaxation, inhibition of platelet aggregation, and fibrinolysis (Furchgott and Vanhoutte, 1989; Brown et al., 2000). Kinins are released *in vivo* by tissue kallikrein, synthesized in several organs, including arteries and heart (Meneton et al., 2001), and are mainly inactivated in the circulation by the angiotensin I-converting enzyme (ACE)/kininase II. Kinins activate two receptor subtypes B1 (B1R) and B2 (B2R). B2R is considered as the only receptor constitutively synthesized in tissues, whereas B1R is induced in pathologic situations, especially in diabetes and ischemia (Leeb-Lundberg et al., 2005). Lack of kallikrein and kinins, or suppression of kinin action, have deleterious consequences in experimental cardiac and renal ischemic diseases, suggesting that kinin actions afford organ protection in these diseases (Yang et al., 1997; Griol-Charhbili et al., 2005; Kakoki et al., 2007). Previous studies in nondiabetic animals suggest that kinin effects in cardiac ischemia are mainly triggered through B2R activation, (Griol-Charhbili et al., 2005; Xi et al., 2008), whereas the effect of B1R remains controversial (Gross and Gross, 2006; Yin et al., 2007). The role of the two kinin receptors in cardiac ischemia in the setting of diabetes is unknown.

Bioavailability in kinins is probably a limiting factor in cardiac protection, even after ACE inhibition (Alhenc-Gelas et al., 2011). Recently, potent selective and long-acting kinin receptor agonists (B1R agonist: SarLys[Hyp3, Igl5, DPhe8]desArg9-bradykinin, B2R agonist: [Hyp(3),Thi(5),(N)Chg(7),Thi(8)]-bradykinin) have been synthesized (Belanger et al., 2009; Cote et al., 2009). The aim of the present study was to evaluate the effects on IS of these agonists in a model of myocardial IR injury in nondiabetic (NDiab) and in diabetic (Diab) mice. We also examined the effect of B1R and B2R agonists on signaling pathways involved in cardioprotection during acute ischemia and early reperfusion, reperfusion ischemia salvage kinase (RISK) pathway, and glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) (Ovize et al., 2010).

Materials and Methods

Animals, Diabetes Induction. Ten-week-old male C57BL/6J mice (20–25 g) (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) were used. Diabetes was induced by five daily intraperitoneal injections of streptozotocin, (50 μ g/g body weight in 0.05 mol/l sodium citrate, pH 4.5). NDiab mice received vehicle. Experiments were performed 4–5 weeks after the first injection in NDiab mice and Diab mice having fasting glycemia ≥ 250 mg/dl ($n = 4$ –13 per group). All mice were housed with a 12-hour light/dark cycle, and had free access to food and water. All experimental procedures were performed in accordance with European legislation for the care and use of laboratory animals (L 358-86/609/EEC).

Effect of Kinin Receptor Agonists on Blood Pressure and Heart Rate. Structure and main pharmacological properties of the synthetic biostable selective bradykinin B1R agonist SarLys[Hyp3, Igl5, DPhe8]desArg9-bradykinin and the B2R agonist [Hyp(3),Thi(5), (N)Chg(7),Thi(8)]-bradykinin have been described previously (Belanger et al., 2009; Cote et al., 2009). Dose-response effects on blood pressure were studied in NDiab and Diab mice. Mice were anesthetized by an injection of sodium pentobarbital (60 mg/kg *i.p.*). A catheter was inserted into the left carotid artery for continuous recording of blood pressure and heart rate (MP100; Biopac Systems, Cerom, Paris, France). The effect on blood pressure of increasing doses of B1R or B2R agonist from 0.01 to 10 nmol/kg (1 μ l/g body weight bolus injected at 5–10-minute intervals via the jugular vein) was followed ($n = 9$ –11 mice/dose). The effect of bradykinin at the same doses was also studied for comparison. HOE140 (D-Arg-[Hyp3, Thi5, D-Tic7, Oic8]bradykinin) (Icatibant; Aventis Pharma, Frankfurt, Germany), a specific B2 receptor antagonist (Hock et al., 1991), was injected (500 μ g/kg) in mice 5 minutes prior to B2R agonist injection. Mean arterial pressure (MAP) was calculated as: $[(2 \times \text{diastolic blood pressure}) + \text{systolic blood pressure}]/3$. Doses of agonists to be used in cardiac IR experiments were determined from these studies.

Myocardial IR Injury Procedure. The procedure was done as previously described (Griol-Charhbili et al., 2005; Messadi-Laribi et al., 2007; Messadi et al., 2010). The left anterior descending coronary artery was occluded 2 mm from the tip of the left atrium for 30 minutes. Reperfusion was maintained for a 2-hour period, except as otherwise specified. At the end of the experiment, the coronary artery was reoccluded and 5% Evans Blue solution was injected into the jugular vein to delineate the area at risk (AR). The heart was then removed and the left ventricle (LV) was isolated, weighed, and cut transversely into four slices from base to apex. The slices were then incubated with buffered 1% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) solution for 20 minutes to determine IS. The tissue sections were then fixed in buffered 10% formalin solution for 24 hours and photographed. Viable myocardium in the AR appeared stained brick red, whereas necrotic tissue was pale white. Area at risk and IS were quantified by an observer kept unaware of treatment using the Scion Image software (Scion Image for Windows; Scion Corporation, Frederick, MD). Infarct size was expressed as percentage of AR.

Effect of Kinin Receptor Agonists on IR Injury. Animals received either saline or the B1R or B2R agonist given as an *i.v.* bolus (1 or 3 nmol/kg for B1R agonist, 0.01 or 0.1 nmol/kg for B2R agonist), administered into jugular vein 2 minutes before reperfusion followed by 2 hours of infusion (0.5 or 1.5 nmol/kg/h for B1R agonist, 0.005 or 0.05 nmol/kg/h for B2R agonist). To test specificity of the cardioprotective effect of the agonists, additional mice receiving B1R or B2R agonist were pretreated either with a B2R antagonist HOE140 (Icatibant, 500 μ g/kg *i.v.*) or a B1R antagonist (SSR240612; [(2R)-2-[[[(3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[(6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl]amino]-3-(4-[[[2R,6S]-2,6-dimethylpiperidinyl]methyl]phenyl]-N-isopropyl-N-methylpropanamide hydrochloride], 300 μ g/kg kindly provided by J. Gougat, Sanofi, Montpellier, France) (Gougat et al., 2004), 5 minutes before the onset of ischemia.

To compare the effects of kinin receptor agonists to established cardioprotective treatments, additional groups of NDiab and Diab mice received the ACE inhibitor, ramiprilat (50 μ g/kg) (Aventis Pharma) 2 minutes before reperfusion or were submitted to ischemic postconditioning (IPostC), performed at the end of the 30-minute occlusion period by a sequence of three successive cycles, each consisting of 1 minute of coronary occlusion followed by 1 minute of reperfusion, followed by 2-hour reperfusion according to Roubille et al. (2011).

Quantification of Kinin Receptor mRNA. Relative changes in mRNA level of kinin receptors were quantified in dedicated series of mice, diabetic and nondiabetic, submitted to ischemia-reperfusion injury or sham-operated, using real-time polymerase chain reaction (Bodin et al., 2009). After 10 minutes of reperfusion, the heart was excised, washed in cold isotonic saline, and AR was dissected and rapidly frozen in liquid nitrogen. Total RNA was isolated from the LV

using TRIzol (Life Technologies, St. Aubin, France). The cDNAs were synthesized, amplified and quantified using TaqMan Gene Expression Assays and Assays-on-Demand Gene Expression Probes for B1R and B2R (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) in an ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Data were normalized to 18S rRNA. Changes in the target gene relative to the mean expression in the NDiab sham-operated group were calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ comparative method for each sample (Livak and Schmittgen, 2001).

Analysis by Western-Blot of Reperfusion Injury Salvage Kinases and GSK-3 β . Protein level and phosphorylation status of kinases of the RISK pathway (Ovize et al., 2010) and of GSK-3 β were studied early after reperfusion in dedicated series of diabetic and nondiabetic mice treated with agonist or saline as described above and in sham-operated animals. After 10 minutes of reperfusion, AR was dissected and sampled as described above. Membranes were blotted with P-Akt (Ser473), Akt (Ser473), P-extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) (Thr202/Tyr204), ERK1/2 (Thr202/Tyr204), P-GSK-3 β (Ser9), GSK-3 β (Ser9) (all from Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Signals were detected in ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Vélizy, France) and quantified using Multi Gauge software 2.0 (FujiFilm, Tokyo, Japan).

Statistical Analysis. Data are presented as means \pm S.E.M. Effect of ischemia-reperfusion and agonist treatment on infarct size and signaling pathways was assessed by using one-way analysis-of-variance followed, when appropriate, by the Fisher protected least significant difference post hoc test. Student's *t* test was used to assess effect of B1R and B2R blockers on agonist action. Effects of diabetes and ischemia on receptor mRNA level were assessed by two-way analysis-of-variance. Significance was set at $P < 0.05$.

Results

Dose Response Effect of Kinin Receptor Agonists on Blood Pressure and Heart Rate. The B2R agonist [Hyp(3),Thi(5),(N)Chg(7),Thi(8)]-bradykinin decreased MAP in a dose-dependent manner (Fig. 1A). Tachycardia occurred only at 1 nmol/kg and above (Fig. 1B). The effect of the B2R agonist on blood pressure was up to 2.5 times stronger and lasted >3 times longer than the effect of bradykinin at equimolar doses (not shown). It was inhibited $>90\%$ by pretreatment with the B2R antagonist HOE140 (not shown). The hypotensive effect was similar in NDiab and Diab mice (Fig. 1A). The B1R agonist SarLys[Hyp3, Igl5, DPhe8]desArg9-bradykinin had no effect on MAP and heart rate for doses up to 10 nmol/kg, in NDiab or Diab mice (not shown). Doses of 0.01 and 0.1 nmol/kg for B2R agonist that did not induce tachycardia and of 1 and 3 nmol/kg for B1R agonist were chosen for IR studies.

B2R Agonist Reduces Infarct Size in Nondiabetic Mice and B1R Agonist in Diabetic Mice. Glycemia, body weight, LV weight, and AR of mice receiving either saline or the different investigated drugs are presented in Table 1. Body weight and relative LV weight were lower in Diab than in NDiab mice ($P < 0.05$). Mean fasting glycemia was similar in all groups of Diab mice. AR/LV ratios did not differ among experimental groups. Infarct size of saline-treated mice was similar in NDiab and Diab mice (Figs. 2 and 3).

In NDiab mice, the B2R agonist at 0.01 and 0.1 nmol/kg markedly reduced IS by 37 and 47%, respectively, compared with saline ($P < 0.05$), as did ramiprilat or IPostC (32 and 52%, respectively, $P < 0.05$). The B2R antagonist HOE140 totally suppressed the cardioprotective effect of the B2R agonist. The IS was not significantly altered by B1R agonist treatment at 1 and 3 nmol/kg (Fig. 2).

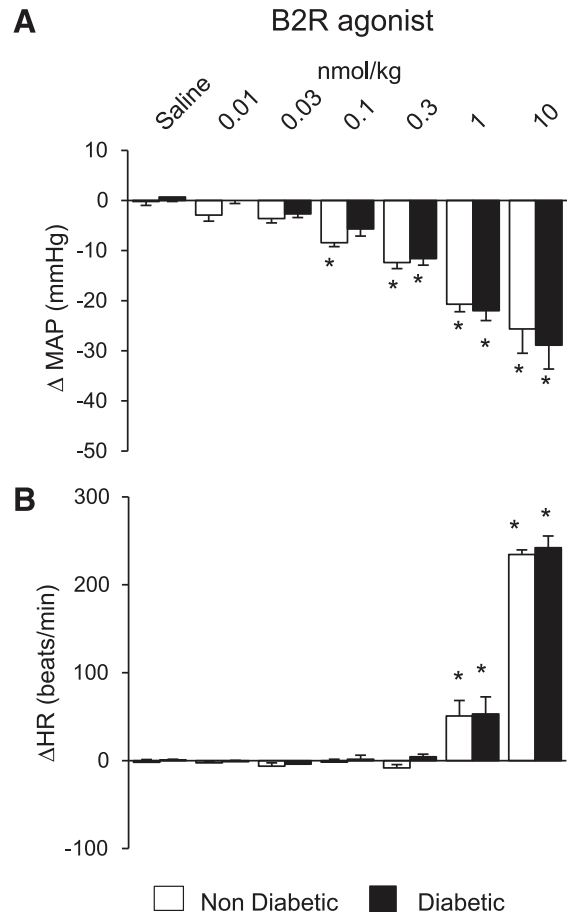


Fig. 1. Dose response effect on MAP (A) and heart rate (HR) (B) of the B2R agonist ([Hyp(3),Thi(5),(N)Chg(7),Thi(8)]-bradykinin) in nondiabetic (open bars) and diabetic (black bars) mice. Blood pressure was recorded through a catheter inserted into the carotid artery. Treatments were administered as bolus in the jugular vein. Results are expressed as maximal variations of mean arterial pressure (Δ MAP) or heart rate (Δ HR). Data are mean \pm S.E.M., $n = 9$ –11 per group. One-way analysis-of-variance followed by Fisher post hoc test, * $P < 0.05$ versus saline

In Diab mice, the B2R agonist had no cardioprotective effect at both doses. Similarly, ramiprilat and IPostC failed to reduce IS. However, the B1R agonist decreased IS by 44 and 43% at 1 and 3 nmol/kg, respectively ($P < 0.05$). This effect was abolished by pretreatment with the B1R antagonist SSR240612 (Fig. 3).

Kinin Receptors in the Heart. Cardioprotective Effect of Agonists Is Associated with Activation of Reperfusion Ischemia Salvage Kinases and Inhibition of GSK-3 β . Diabetes induced a 3.5-fold increase in cardiac B1R mRNA level ($P < 0.05$) but had no effect on B2R mRNA. Ischemia-reperfusion had no effect on B1R or B2R mRNA (Table 2).

Total immunoreactive Akt, ERK1/2, and GSK-3 β levels were not changed by IR, B1R, or B2R agonist administration compared with sham-operated mice. Ischemia-reperfusion induced a 2.5-fold increase in phosphorylation of Akt and ERK1/2 in heart of NDiab and Diab mice compared with sham-operated mice ($P < 0.05$), whereas phosphorylation of GSK-3 β was not significantly altered (Fig. 4). In NDiab mice, the B2R agonist increased phospho-Akt and phospho-GSK-3 β compared with saline-treated group ($P < 0.05$) but had no effect on phospho-ERK1/2. No effect on phosphorylation of

TABLE 1

Glycemia, body weight, and cardiac parameters of nondiabetic and diabetic mice subjected to IR injury

Data are mean \pm S.E.M.

Treatment	n	FG	BW	LVW/BW	AR
		mg/dl	g	mg/g	% LV
Nondiabetic					
Saline	9	113 \pm 9	24.9 \pm 0.2	3.3 \pm 0.1	30.9 \pm 1.9
Ramiprilat	10	116 \pm 5	25.4 \pm 0.1	3.6 \pm 0.1	30.7 \pm 1.9
IPostC	7	132 \pm 7	25.4 \pm 0.1	3.3 \pm 0.1	29.9 \pm 1.8
B2R 0.01 nmol/kg	8	109 \pm 8	24.5 \pm 0.2	3.5 \pm 0.1	28.3 \pm 2.1
B2R 0.1 nmol/kg	8	123 \pm 12	24.8 \pm 0.2	3.4 \pm 0.1	28.8 \pm 1.3
B2R + HOE140	4	112 \pm 6	24.5 \pm 0.1	3.3 \pm 0.1	27.6 \pm 1.1
B1R 1 nmol/kg	5	114 \pm 10	24.0 \pm 0.2	3.6 \pm 0.2	30.6 \pm 2.5
B1R 3 nmol/kg	5	127 \pm 14	25.9 \pm 0.3	3.3 \pm 0.2	30.5 \pm 2.5
Diabetic					
Saline	13	408 \pm 6	23.4 \pm 0.6	3.1 \pm 0.1	27.9 \pm 1.1
Ramiprilat	7	404 \pm 9	22.1 \pm 0.3	3.3 \pm 0.1	29.4 \pm 1.6
IPostC	5	412 \pm 12	22.4 \pm 0.4	3.0 \pm 0.1	28.8 \pm 2.2
B2R 0.01 nmol/kg	8	400 \pm 9	24.5 \pm 0.3	3.2 \pm 0.1	32.5 \pm 1.9
B2R 0.1 nmol/kg	10	385 \pm 8	23.8 \pm 0.2	3.0 \pm 0.1	30.5 \pm 1.4
B1R 1 nmol/kg	9	401 \pm 8	22.0 \pm 0.6	3.0 \pm 0.1	29.4 \pm 1.6
B1R 3 nmol/kg	6	457 \pm 13	22.2 \pm 0.5	3.3 \pm 0.1	26.8 \pm 0.9
B1R + SSR240612	12	418 \pm 6	21.7 \pm 0.1	2.8 \pm 0.3	27.8 \pm 0.9

FG, fasting glycemia; BW, body weight; LVW/BW, left ventricle weight to body weight ratio.

Akt, ERK1/2, and GSK-3 β was observed in B1R-treated NDiab mice. In contrast, in Diab mice, B1R agonist increased phospho-Akt, phospho-ERK1/2, and phospho-GSK-3 β compared with saline ($P < 0.05$). In B2R-treated Diab mice, no effect on kinase phosphorylation was observed.

Discussion

The present study documents cardioprotective effects of synthetic specific kinin receptor agonists given at reperfusion in IR in mice. We demonstrate differential sensitivity to either B2R or B1R agonism of the ischemic heart of nondiabetic and diabetic animals. Pharmacological activation of B1R has a unique feature among cardioprotective agents, as it overcomes diabetes-induced resistance to established cardioprotective treatments, activates the RISK pathway, and reduces IS.

In the present study, there was no difference in IS between saline-treated nondiabetic and diabetic mice. Previous studies of IR injury in diabetic animals have brought conflicting results concerning effect of diabetes on IS. Some studies have suggested that hyperglycemia increases IS in IR (Marfella et al., 2004; Di Filippo et al., 2005), while others reported an IS-reducing effect or no effect at all (Liu et al., 1993; Mozaffari and Schaffer, 2003; Gross et al., 2007). Duration of diabetes and level of insulin may influence myocardial tolerance against ischemia (Miki et al., 2012). Our data indicate that one month of insulinopenic diabetes in mice has no influence on IS in our experimental conditions but impairs effect of cardioprotective treatments.

B2R Agonism. A number of studies have suggested a major role for kinins and B2R in myocardial protection during IR using mice or rats with genetic inactivation of the kallikrein-kinin system or pharmacological B2R blockade (Linz et al., 1996; Yang et al., 1997; Griol-Charhbil et al., 2005; Penna et al., 2007; Xi et al., 2008). In the present study, we describe the cardioprotective effect of direct and specific activation of the B2R in mice. The IS-reducing effect of the B2R agonist

was similar to the effect of IPostC or the ACE inhibitor ramiprilat. These findings further document the role of B2R signaling in cardioprotection during ischemia by using a gain-of-function approach. They are consistent with previous observation of a prominent role of kinins and B2R in the IS reducing effect of ACE inhibition, angiotensin II AT1 receptor blockade, or ischemic pre- and postconditioning in nondiabetic mice. Pharmacological or genetic inactivation of B2R suppresses this effect (Linz et al., 1996; Griol-Charhbil et al., 2005; Messadi-Laribi et al., 2007; Xi et al., 2008). Our observations are also consistent with ex vivo studies documenting prevention of IR injury by bradykinin in isolated perfused rodent hearts (Bell and Yellon, 2003; Yang et al., 2004). However, in vivo, when administered intravenously, bradykinin is quickly inactivated by lung peptidases. The B2 agonist [Hyp(3),Thi(5),(N)Chg(7),Thi(8)]-bradykinin is resistant to this inactivation. Kallikrein gene therapy has been attempted in IR but the procedure is not adapted to treatment of established ischemia (Yoshida et al., 2000).

Most studies on cardioprotection in IR have been undertaken in nondiabetic animals. Interestingly, available reports showed that rodents with diabetes are resistant to ischemic or pharmacological pre- or postconditioning in cardiac ischemia (Gross et al., 2007; Bouhidet et al., 2008; Miki et al., 2009; Zhu et al., 2012). Consistent with these previous studies, we observed that the IS-reducing effect of IPostC or ramiprilat was lost in diabetic mice. We also show that a B2R agonist is also ineffective in these mice. Cardiac B2R mRNA level was not decreased in the diabetic heart. However, B2R activation did not trigger Akt or GSK-3 β phosphorylation, contrary to B1R activation. This observation suggests that B2R signaling is impaired upstream of Akt in the diabetic heart.

B1R Agonism. In contrast with the well-established role of B2R in kinin-mediated myocardial protection in ischemia, the role of B1R in this setting remained uncertain. Detrimental implication of B1R during IR has been suggested in isolated perfused mouse hearts by using pharmacological blockade of B1R and B1R gene knockout mice (Lagneux et al., 2002; Xi et al., 2008), whereas a cardioprotective effect of B1R activation in the rat, mediated partially by a reduction in sympathetic outflow, has been reported (Chahine et al., 1993). Another study showed that Arg9-BK, the natural agonist of B1R, had no cardioprotective effect in cardiac ischemia in nondiabetic rats (Yin et al., 2007). We previously observed that pharmacological B1R blockade had no effect on IR injury in nondiabetic mice, contrary to B2R blockade (Griol-Charhbil et al., 2005). Consistent with these reports, the present study shows that a B1R agonist has no effect on cardiac necrosis in nondiabetic mice. Thus, different experimental approaches relying on either loss or gain of function of B1R suggest that this receptor is not importantly involved in cardioprotection in acute ischemia in nondiabetic mice.

However, our findings highlight a major cardioprotective effect of a pharmacological B1R agonist in acute ischemia in diabetic mice. Diabetes has been associated with upregulation of B1R synthesis in different organs including the heart (Bodin et al., 2009; Westermann et al., 2009). Consistent with these studies, we show that B1R mRNA was increased in myocardium of diabetic mice, with no additive effect of ischemia reperfusion, at least at the early time of reperfusion studied. However, to our knowledge, the role of B1R in the diabetic and

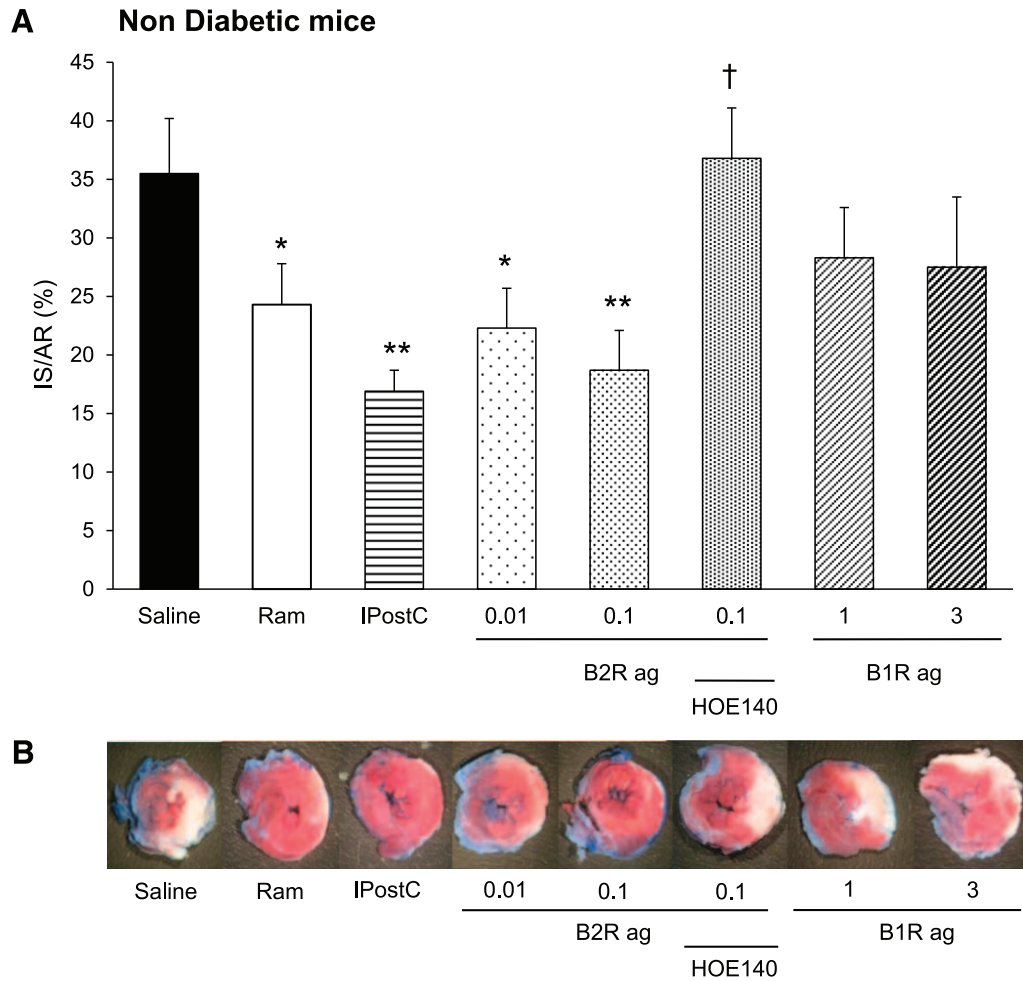


Fig. 2. Effect of B2R agonist (B2R ag), B1R agonist (B1R ag), ramiprilat (Ram), and IPostC on IS in nondiabetic mice. Mice were subjected to 30 minutes of coronary occlusion followed by 2 hours of reperfusion. B2R (0.01 and 0.1 nmol/kg) and B1R (1 and 3 nmol/kg) agonists and ramiprilat (50 μ g/kg) were administered 2 minutes before reperfusion. Ischemic postconditioning was performed at the end of the occlusion period by performing three cycles of 1-minute coronary occlusion and 1-minute reperfusion. The B2R antagonist HOE140 (500 μ g/kg) were administered 5 minutes before occlusion followed by 0.1 nmol/kg of B2R agonist given 2 minutes before reperfusion. (A) Data are mean \pm S.E.M., $n = 5$ –12 animals per group. One-way analysis-of-variance followed by Fisher post hoc test, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ versus saline; † $P < 0.05$ versus B2R agonist alone. (B) Representative midmyocardial cross-sections of 1% TTC-stained hearts of each experimental group. White area, infarcted tissue; red area (i.e., TTC-positive), viable myocardium.

ischemic heart has not been studied. Our observation of B1R-mediated cardioprotection in diabetic animals can be linked to the hypothesis of impaired B2R signaling in the diabetic heart discussed in the B2R Agonism section. Indeed, in nondiabetic mice genetically deficient in B2R, the B1R was shown to take over kinin-triggered cardioprotection (Griol-Charhbil et al., 2005). Moreover, the B1R is known to be resistant to agonist-induced desensitization (Leeb-Lundberg et al., 2005). Given functionality of the B1R in diabetic heart, the lack of cardioprotective effect of ACE/kininase II inhibitors in the diabetic and ischemic heart may appear surprising. However, the natural agonist of B1R is Des-arg⁹ bradykinin released from bradykinin by the action of carboxypeptidase N. Reduced kinin-forming and -converting activities in the diabetic heart may explained this resistance to ACE inhibition (Spillmann et al., 2006). In any case, the B1R agonist is, to the best of our knowledge, the only pharmacological agent reported so far to exert strong cardioprotective action in the setting of IR in diabetic animals. It is not known however whether B1R activation can provide cardioprotection against ischemia-reperfusion injury at a more advanced stage of diabetic

cardiomyopathy and myocardial inflammation, where detrimental effect of the B1R gene on cardiac function has been documented (Westermann et al., 2009).

Signaling. Recent data suggest that bradykinin protects the heart at reperfusion by modulating mitochondrial permeability transition pore opening through inhibition of GSK-3 β (Juhászova et al., 2004). In isolated perfused hearts bradykinin exerts cardioprotection through PI3-kinase/Akt activation leading to GSK-3 β inactivation (Bell and Yellon, 2003; Yang et al., 2004). Our data suggest a critical role for this pathway in myocardial protection afforded by the agonists (Hausenloy and Yellon, 2004). Indeed cardioprotection by B1R or B2R agonist was consistently associated with Akt and GSK-3 β phosphorylation, whereas lack of IS-reducing effect of the agonists (B1R agonist in nondiabetic or B2R agonist in diabetic mice) was associated with lack of GSK-3 β phosphorylation. Tsang et al. (2005) have reported that the threshold for ischemic preconditioning-induced cardioprotection was increased in diabetic rats due to impairment of prosurvival signaling cascades. B1R induction in the diabetic heart may allow the threshold for RISK pathway activation

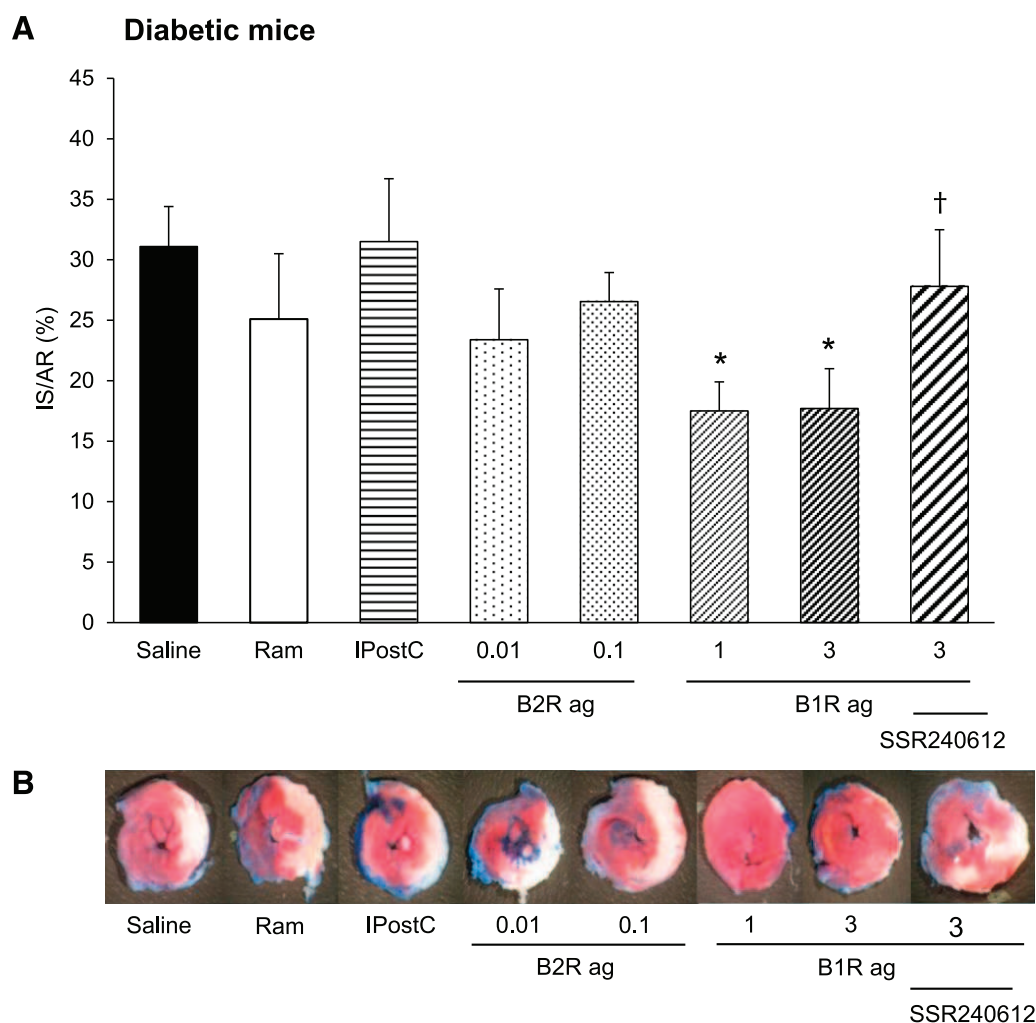


Fig. 3. Effect of B2R agonist (B2R ag), B1R agonist (B1R ag), ramiprilat (Ram), and IPostC on IS in diabetic mice. Mice were subjected to 30 minutes of coronary occlusion followed by 2 hours of reperfusion. B2R (0.01 and 0.1 nmol/kg) and B1R (1 and 3 nmol/kg) agonists and ramiprilat (50 μ g/kg) were administered 2 minutes before reperfusion. Ischemic postconditioning was performed at the end of the occlusion period by performing three cycles of 1-minute coronary occlusion and 1-minute reperfusion. The B1R antagonist SSR240612 (300 μ g/kg) was administered 5 minutes before occlusion followed by 3 nmol/kg of B1R agonist given 2 minutes before reperfusion. (A) Data are mean \pm S.E.M., $n = 5$ –12 animals per group. One-way analysis-of-variance followed by Fisher post hoc test, * $P < 0.05$ versus saline; † $P < 0.05$ versus B1R agonist alone. (B) Representative midmyocardial cross-sections of TTC-stained hearts of each experimental group. White area, infarcted tissue; red area (i.e., TTC-positive), viable myocardium.

and myocardial protection to be reached during B1R agonist stimulation.

The streptozotocin-induced diabetes model is closely related to type 1 diabetes but not to type 2. We cannot extrapolate our results to type 2 diabetes models where other mechanisms of

cardioprotection resistance, like endoplasmic reticulum stress, have been described (Miki et al., 2009). Further studies are needed to explore the effect of B1R agonist in type 2 diabetes models.

In conclusion, we identified a novel cardioprotective approach in acute cardiac ischemia based on pharmacological agonism of kinin receptors. Pharmacological activation of B2R reduces IS during cardiac IR in nondiabetic mice via activation of PI3-kinase/Akt pathway. We uncovered a unique and strong cardioprotective effect of B1R agonist in diabetic mice through activation of PI3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathway, while diabetes induces resistance to other cardioprotective agents, including B2R agonist. Thus, individualized pharmacological intervention may provide therapeutic benefit in acute coronary syndrome, using B1R or B2R agonists in patients with and without diabetes, respectively. Occurrence of unwanted side effects like hypotension or edema is however a concern, albeit hypotension does not occur in mice during B1R agonist administration (Alhenc-Gelas et al., 2011).

TABLE 2

B1R and B2R mRNA in the left ventricle of nondiabetic and diabetic mice, sham operated (Sham) or submitted to ischemia reperfusion (IR)

Results are normalized to 18S mRNA and expressed relative to nondiabetic sham-operated group. Data are mean \pm S.E.M. Number of animals is indicated in parentheses.

	B1R	B2R
Nondiabetic Sham	1.00 \pm 0.15 (7)	1.00 \pm 0.20 (6)
Nondiabetic IR	1.26 \pm 0.32 (8)	0.86 \pm 0.12 (7)
Diabetic Sham	3.56 \pm 1.10 (7)	1.18 \pm 0.14 (6)
Diabetic IR	2.53 \pm 1.11 (7)	1.20 \pm 0.20 (7)
Two-Way ANOVA		
Diabetes effect	$P < 0.05$	NS
IR effect	NS	NS

ANOVA, analysis-of-variance; NS, not significant.

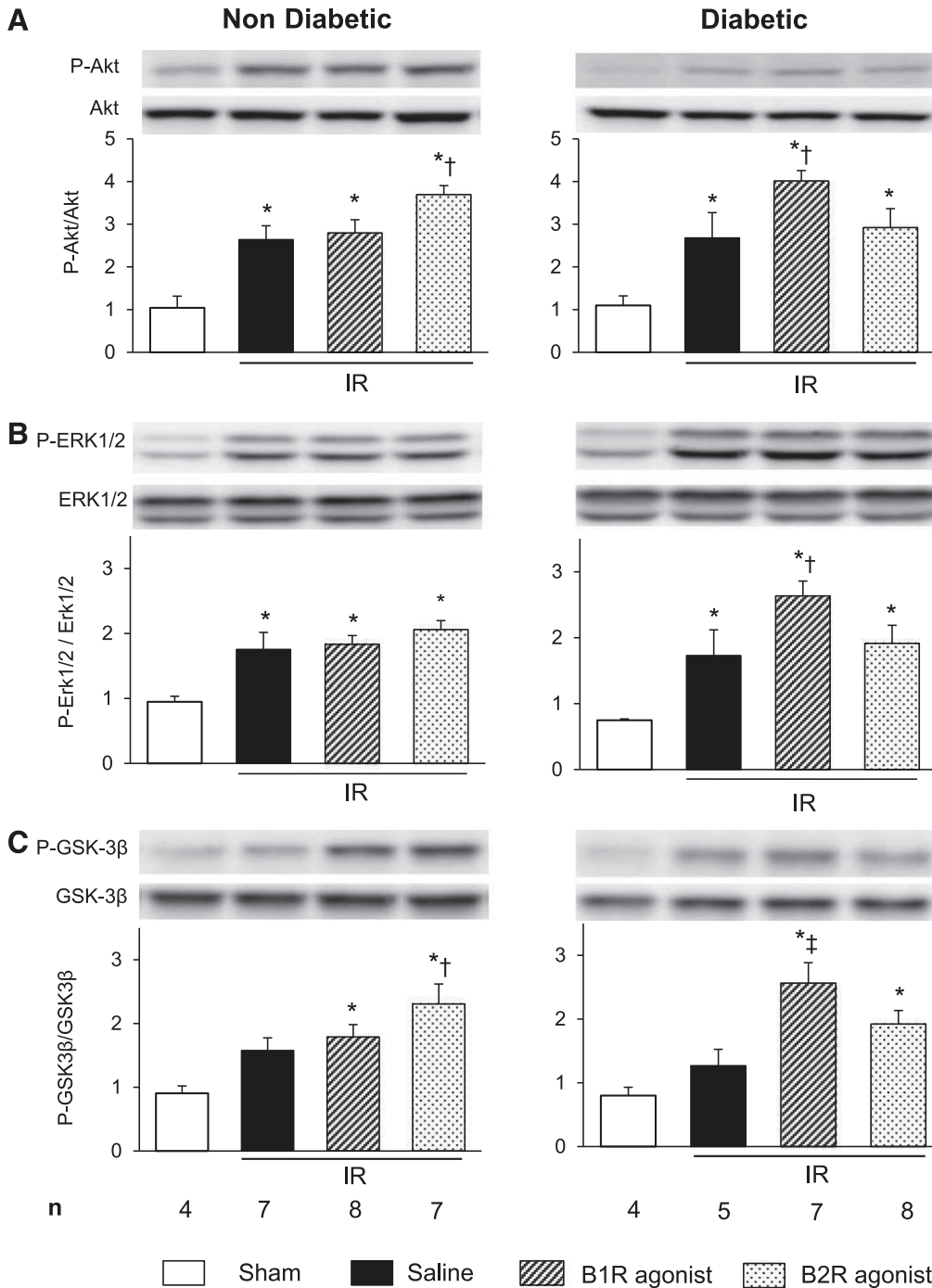


Fig. 4. Effect of saline, B1R agonist (B1R), and B2R agonist (B2R) on phosphorylation of Akt (A), ERK1/2 (B), and GSK-3 β (C) in the myocardium of ischemia reperfusion (IR)-operated nondiabetic and diabetic mice. Values are expressed as ratios of phosphorylated protein to total protein (arbitrary units). Number of animals is indicated below graphs. Data are mean \pm S.E.M. One-way analysis-of-variance followed by Fisher post hoc test, * $P < 0.05$ versus corresponding sham; † $P < 0.05$; *† $P < 0.01$ versus corresponding saline.

Authorship Contributions

Participated in research design: Potier, Richer, Marre, Alhenc-Gelas, Bouby.

Conducted experiments: Potier, Waeckel, Vincent, Chollet.

Contributed new reagents or analytic tools: Gobeil.

Performed data analysis: Potier, Waeckel, Bruneval, Richer, Roussel, Bouby.

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Potier, Gobeil, Marre, Richer, Roussel, Alhenc-Gelas, Bouby.

References

Alhenc-Gelas F, Bouby N, Richer C, Potier L, Roussel R, and Marre M (2011) Kinins as therapeutic agents in cardiovascular and renal diseases. *Curr Pharm Des* 17: 2654–2662.

Bélanger S, Bovenzi V, Côté J, Neugebauer W, Amblard M, Martinez J, Lammek B, Savard M, and Gobeil F, Jr (2009) Structure-activity relationships of novel peptide agonists of the human bradykinin B2 receptor. *Peptides* 30:777–787.

Bell RM and Yellon DM (2003) Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS. *J Mol Cell Cardiol* 35:185–193.

Bodin S, Chollet C, Goncalves-Mendes N, Gardes J, Pean F, Heudes D, Bruneval P, Marre M, Alhenc-Gelas F, and Bouby N (2009) Kallikrein protects against microalbuminuria in experimental type I diabetes. *Kidney Int* 76:395–403.

Bouhidel O, Pons S, Souktani R, Zini R, Berdeaux A, and Ghaleh B (2008) Myocardial ischemic postconditioning against ischemia-reperfusion is impaired in ob/ob mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295:H1580–H1586.

Brown NJ, Gainer JV, Murphey LJ, and Vaughan DE (2000) Bradykinin stimulates tissue plasminogen activator release from human forearm vasculature through B(2) receptor-dependent, NO synthase-independent, and cyclooxygenase-independent pathway. *Circulation* 102:2190–2196.

Chahine R, Adam A, Yamaguchi N, Gaspo R, Regoli D, and Nadeau R (1993) Protective effects of bradykinin on the ischaemic heart: implication of the B1 receptor. *Br J Pharmacol* 108:318–322.

- Côté J, Savard M, Bovenzi V, Bélanger S, Morin J, Neugebauer W, Larouche A, Dubuc C, and Gobeil F, Jr (2009) Novel kinin B1 receptor agonists with improved pharmacological profiles. *Peptides* **30**:788–795.
- Danaei G, Lawes CM, Vander Hoorn S, Murray CJ, and Ezzati M (2006) Global and regional mortality from ischaemic heart disease and stroke attributable to higher-than-optimum blood glucose concentration: comparative risk assessment. *Lancet* **368**:1651–1659.
- Di Filippo C, Marfella R, Cuzzocrea S, Piegari E, Petronella P, Giugliano D, Rossi F, and D'Amico M (2005) Hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rat increases infarct size associated with low levels of myocardial HO-1 during ischemia/reperfusion. *Diabetes* **54**:803–810.
- Donahoe SM, Stewart GC, McCabe CH, Mohanavelu S, Murphy SA, Cannon CP, and Antman EM (2007) Diabetes and mortality following acute coronary syndromes. *JAMA* **298**:765–775.
- Duckworth W, Abairra C, Moritz T, Reda D, Emanuele N, Reaven PD, Zieve FJ, Marks J, Davis SN, and Hayward R, et al.; VADT Investigators (2009) Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N Engl J Med* **360**:129–139.
- Furchgott RF and Vanhoutte PM (1989) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* **3**:2007–2018.
- Gerczuk PZ and Kloner RA (2012) An update on cardioprotection: a review of the latest adjunctive therapies to limit myocardial infarction size in clinical trials. *J Am Coll Cardiol* **59**:969–978.
- Gougat J, Ferrari B, Sarrazin L, Planchenault C, Poncelet M, Maruani J, Alonso R, Cudennec A, Croci T, and Guagnini F, et al. (2004) SSR240612 [(2R)-2-[(3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[6-methoxy-2-naphthyl]sulfonyl]amino]propanoyl]amino]-3-(4-[[2R,6S)-2,6-dimethylpiperidinyl]methyl]phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamide hydrochloride], a new nonpeptide antagonist of the bradykinin B1 receptor: biochemical and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* **309**:661–669.
- Griol-Charhbil V, Messadi-Laribi E, Bascands JL, Heudes D, Meneton P, Giudicelli JF, Alhenc-Gelas F, and Richer C (2005) Role of tissue kallikrein in the cardioprotective effects of ischemic and pharmacological preconditioning in myocardial ischemia. *FASEB J* **19**:1172–1174.
- Gross ER and Gross GJ (2006) Ligand triggers of classical preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res* **70**:212–221.
- Gross ER, Hsu AK, and Gross GJ (2007) Diabetes abolishes morphine-induced cardioprotection via multiple pathways upstream of glycogen synthase kinase-3beta. *Diabetes* **56**:127–136.
- Hausenloy DJ and Yellon DM (2004) New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* **61**:448–460.
- Hock FJ, Wirth K, Albus U, Linz W, Gerhards HJ, Wiemer G, Henke S, Breipohl G, König W, and Knolle J, et al. (1991) Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vitro studies. *Br J Pharmacol* **102**:769–773.
- Ishihara M, Inoue I, Kawagoe T, Shimatani Y, Kurisu S, Nishioka K, Kouno Y, Umemura T, Nakamura S, and Sato H (2001) Diabetes mellitus prevents ischemic preconditioning in patients with a first acute anterior wall myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **38**:1007–1011.
- Juhászova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, and Antos CL, et al. (2004) Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest* **113**:1535–1549.
- Kakoki M, McGarrah RW, Kim HS, and Smithies O (2007) Bradykinin B1 and B2 receptors both have protective roles in renal ischemia/reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:7576–7581.
- Kannel WB and McGee DL (1979) Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham study. *Circulation* **59**:8–13.
- Lagneux C, Bader M, Pesquero JB, Demenge P, and Ribaut C (2002) Detrimental implication of B1 receptors in myocardial ischemia: evidence from pharmacological blockade and gene knockout mice. *Int Immunopharmacol* **2**:815–822.
- Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Müller-Esterl W, Pettibone DJ, and Zuraw BL (2005) International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* **57**:27–77.
- Linz W, Wiemer G, and Schölkens BA (1996) Role of kinins in the pathophysiology of myocardial ischemia. In vitro and in vivo studies. *Diabetes* **45** (Suppl 1):S51–S58.
- Liu Y, Thornton JD, Cohen MV, Downey JM, and Schaffer SW (1993) Streptozotocin-induced non-insulin-dependent diabetes protects the heart from infarction. *Circulation* **88**:1273–1278.
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**:402–408.
- Marfella R, Di Filippo C, Esposito K, Nappo F, Piegari E, Cuzzocrea S, Berrino L, Rossi F, Giugliano D, and D'Amico M (2004) Absence of inducible nitric oxide synthase reduces myocardial damage during ischemia reperfusion in streptozotocin-induced hyperglycemic mice. *Diabetes* **53**:454–462.
- Meneton P, Bloch-Faure M, Hagege AA, Ruettten H, Huang W, Bergaya S, Ceiler D, Gehring D, Martins I, and Salmon G, et al. (2001) Cardiovascular abnormalities with normal blood pressure in tissue kallikrein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:2634–2639.
- Messadi E, Vincent MP, Griol-Charhbil V, Mandet C, Colucci J, Krege JH, Bruneval P, Bouby N, Smithies O, and Alhenc-Gelas F, et al. (2010) Genetically determined angiotensin converting enzyme level and myocardial tolerance to ischemia. *FASEB J* **24**:4691–4700.
- Messadi-Laribi E, Griol-Charhbil V, Pizard A, Vincent MP, Heudes D, Meneton P, Alhenc-Gelas F, and Richer C (2007) Tissue kallikrein is involved in the cardioprotective effect of AT1-receptor blockade in acute myocardial ischemia. *J Pharmacol Exp Ther* **323**:210–216.
- Miki T, Miura T, Hotta H, Tanno M, Yano T, Sato T, Terashima Y, Takada A, Ishikawa S, and Shimamoto K (2009) Endoplasmic reticulum stress in diabetic hearts abolishes erythropoietin-induced myocardial protection by impairment of phospho-glycogen synthase kinase-3beta-mediated suppression of mitochondrial permeability transition. *Diabetes* **58**:2863–2872.
- Miki T, Itoh T, Sunaga D, and Miura T (2012) Effects of diabetes on myocardial infarct size and cardioprotection by preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Diabetol* **11**:67.
- Mozaffari MS and Schaffer SW (2003) Effect of hypertension and hypertension-glucose intolerance on myocardial ischemic injury. *Hypertension* **42**:1042–1049.
- Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, Heusch G, Vinten-Johansen J, Yellon DM, and Schulz R; Working Group of Cellular Biology of Heart of European Society of Cardiology (2010) Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res* **87**:406–423.
- Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Billot L, Woodward M, Marre M, Cooper M, Glasziou P, and Grobbee D, et al.; ADVANCE Collaborative Group (2008) Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* **358**:2560–2572.
- Penna C, Mancardi D, Rastaldo R, Losano G, and Pagliaro P (2007) Intermittent activation of bradykinin B2 receptors and mitochondrial KATP channels trigger cardiac postconditioning through redox signaling. *Cardiovasc Res* **75**:168–177.
- Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, Elbelghiti R, Cung TT, Bonnefoy E, and Angoulvant D, et al. (2008) Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* **359**:473–481.
- Roubille F, Franck-Miclo A, Covinhas A, Lafont C, Cransac F, Combes S, Vincent A, Fontanaud P, Sportouch-Dukhan C, and Redt-Clouet C, et al. (2011) Delayed postconditioning in the mouse heart in vivo. *Circulation* **124**:1330–1336.
- Spillmann F, Van Linthout S, Schultheiss HP, and Tschöpe C (2006) Cardioprotective mechanisms of the kallikrein-kinin system in diabetic cardiomyopathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **15**:22–29.
- Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Carr RD, and Yellon DM (2005) Preconditioning the diabetic heart: the importance of Akt phosphorylation. *Diabetes* **54**:2360–2364.
- Westermann D, Walther T, Savvatis K, Escher F, Sobirey M, Riad A, Bader M, Schultheiss HP, and Tschöpe C (2009) Gene deletion of the kinin receptor B1 attenuates cardiac inflammation and fibrosis during the development of experimental diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* **58**:1373–1381.
- White HD and Chew DP (2008) Acute myocardial infarction. *Lancet* **372**:570–584.
- Xi L, Das A, Zhao ZQ, Merino VF, Bader M, and Kukreja RC (2008) Loss of myocardial ischemic postconditioning in adenosine A1 and bradykinin B2 receptors gene knockout mice. *Circulation* **118**(14, Suppl):S32–S37.
- Yang XM, Krieg T, Cui L, Downey JM, and Cohen MV (2004) NECA and bradykinin at reperfusion reduce infarction in rabbit hearts by signaling through PI3K, ERK, and NO. *J Mol Cell Cardiol* **36**:411–421.
- Yang XP, Liu YH, Scicli GM, Webb CR, and Carretero OA (1997) Role of kinins in the cardioprotective effect of preconditioning: study of myocardial ischemia/reperfusion injury in B2 kinin receptor knockout mice and kininogen-deficient rats. *Hypertension* **30**:735–740.
- Yellon DM and Hausenloy DJ (2007) Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* **357**:1121–1135.
- Yin H, Chao J, Bader M, and Chao L (2007) Differential role of kinin B1 and B2 receptors in ischemia-induced apoptosis and ventricular remodeling. *Peptides* **28**:1383–1389.
- Yoshida H, Zhang JJ, Chao L, and Chao J (2000) Kallikrein gene delivery attenuates myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion. *Hypertension* **35**:25–31.
- Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, and Vinten-Johansen J (2003) Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**:H579–H588.
- Zhu SG, Xi L, and Kukreja RC (2012) Type 2 diabetic obese db/db mice are refractory to myocardial ischemic post-conditioning in vivo: potential role for Hsp20, F1-ATPase δ and Echs1. *J Cell Mol Med* **16**:950–958.

Address correspondence to: Dr. Nadine Bouby, INSERM U872, Centre de Recherches des Cordeliers, 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006, Paris, France. E-mail: nadine.bouby@cre.jussieu.fr

6. DISCUSSION ET CONCLUSION

Nous montrons donc dans cette étude qu'un agoniste B2R permet de diminuer la taille des lésions d'IR chez des souris non diabétiques. Cet effet cardioprotecteur est perdu chez les souris diabétiques comme les autres méthodes de PostC (Ramiprilat et PostC ischémique). Cependant, nous montrons ici de manière originale, que la stimulation directe du B1R permet de diminuer la taille de l'infarctus chez la souris diabétique.

Cette étude montre donc que la stimulation directe du B2R au moment de la reperfusion limite la taille de l'infarctus dans un modèle de souris non diabétique. Au vu des résultats de la littérature détaillés dans l'introduction, cet effet positif était attendu et confirme le rôle majeur du SKK, via son récepteur B2, dans les mécanismes de PostC. Cet effet est médié par la voie PI3-kinase/Akt permettant la phosphorylation inhibitrice de GSK-3 β . Nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 suggérant que la voie MAPK n'est pas impliquée dans l'effet cardioprotecteur de l'agoniste B2R. Bien que la voie MAPK soit une voie importante des voies de signalisation du PostC (243 , 244), deux études récentes ont également montré que l'effet cardioprotecteur de la BK n'était pas accompagné d'une augmentation de phospho-ERK1/2 (232, 245).

Nous montrons ici que l'activation directe du B1R lors de la reperfusion ne permet pas de diminuer les lésions d'IR et ne s'accompagne pas d'une activation de la voie RISK. Les données de la littérature sont plus contradictoires quant au rôle de B1R durant l'IR et le PostC. En effet, dans des modèles d'ischémie cardiaque ou rénale utilisant des souris déficientes en B1R, des effets positifs ou négatifs ont été décrit (237, 240, 246-249). Du fait de régulations compensatrices observées chez les souris déficientes en B1R, ces résultats sont difficilement interprétables. L'utilisation d'agoniste du B1R permet d'étudier l'activation isolée, dans un contexte physiologique, du B1R en l'absence de régulation. Nos résultats sont

donc en faveur d'une absence d'implication du B1R dans le PostC en l'absence de diabète. L'absence, ou la très faible expression du B1R chez les souris sauvages peut expliquer cette absence d'effet.

Les résultats issus des expériences faites chez les souris diabétiques montrent que la taille de l'infarctus est similaire aux souris non diabétiques, de même que la phosphorylation induite par l'ischémie d'Akt et de ERK1/2. Nos données suggèrent donc que 4-5 semaines de diabète insulino-prive n'affectent pas la taille des lésions d'IR. En revanche, et en accord avec les données de la littérature, l'effet protecteur des manœuvres de PostC, efficaces chez la souris non diabétiques, est aboli dans notre modèle de diabète. En effet, le PostC ischémique, manœuvre de référence pour le PostC, l'administration d'agoniste B2R ou d'IEC, ne permettent pas de diminuer de la taille de l'infarctus chez les souris diabétiques. L'absence d'effet de l'agoniste B2R est associée à l'absence d'effet sur la phosphorylation d'Akt, ERK1/2 et GSK-3 β . Ces données sont cohérentes avec l'hypothèse selon laquelle la résistance au PostC induite par le diabète serait liée à un défaut d'activation des voies de signalisation intracellulaire aboutissant à la phosphorylation de GSK-3 β (214, 229, 250). Il est possible que le seuil d'activation des voies de signalisation soit augmenté lors du diabète comme suggérée par certaines études (227). L'augmentation des doses d'agoniste B2R administré au moment de la reperfusion pourrait peut-être vaincre la résistance au PostC induit par le diabète. Cependant, nos études préliminaires sur l'effet tensionnel des agonistes ont montré que des doses plus fortes entraînent une diminution importante de la pression artérielle associée à une tachycardie dont les conséquences dans un contexte d'IR serait probablement délétère pour le myocarde, notamment en augmentant le risque d'arythmie (251).

Un des résultats le plus intéressants de ces expériences est l'effet de l'administration de l'agoniste B1R au moment de la reperfusion chez les souris diabétiques. Nous observons en effet une diminution de la taille de l'infarctus aux 2 doses testées. Cet effet cardioprotecteur

s'accompagne d'une inhibition de GSK-3 β via l'activation de la voie PI3Kinase/Akt mais aussi MAPK. Les résultats contradictoires des études précédentes et l'absence d'étude de la stimulation directe du B1R dans ce type de modèle rend nos résultats originaux. En effet le rôle du B1R dans l'IR lors du diabète n'était pas connu. Nous montrons donc que la stimulation directe du B1R permet de vaincre la résistance au PostC induite par le diabète.

Nos résultats mettent donc en évidence le rôle majeur du SKK dans le PostC de l'IR. L'utilisation, pour la première fois dans la littérature, d'agonistes sélectifs de chaque récepteur nous a également permis de préciser le rôle respectif de chaque récepteur dans les mécanismes de PostC chez la souris non diabétique et diabétique. Nous confirmons le rôle cardioprotecteur du B2R lors de l'IR en l'absence de diabète et mettons en évidence pour la première fois l'effet bénéfique du B1R lors du diabète. S'il reste à mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la résistance au PostC induite par le diabète et la capacité de l'agoniste B1R à vaincre cette résistance, ces résultats pourraient représenter une première étape vers le développement clinique d'un nouveau traitement préventif des lésions de reperfusion après syndrome coronarien aigu chez le patient non diabétique et diabétique.

CHAPITRE VII : DISCUSSION GENERALE

Le SKK est un système peptidique principalement d'action vasomotrice. Il est régulé par la kalllicréine tissulaire qui l'active en transformant le kininogène en kinines, peptides actifs du système. Par ailleurs, l'ECA ou kininase II inhibe le SKK en dégradant les kinines. Les kinines exercent leurs actions en activant deux types de récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G, le récepteur B1 et le récepteur B2. Le récepteur B2 est le récepteur principal, constitutivement exprimé dans de nombreux organes. Il est impliqué dans la plupart des actions physiologiques des kinines, notamment l'activation endothéliale. Le récepteur B1 est un récepteur inductible puisqu'il est synthétisé uniquement dans des situations pathologiques notamment inflammatoires dont le diabète. Le mécanisme de l'induction du récepteur B1, les voies de signalisation intracellulaire qu'il active, et son rôle exact ne sont pas encore très bien compris.

Au-delà de son action vasodilatatrice sur l'endothélium, le SKK est impliqué dans de nombreux processus physiopathologiques et notamment dans le diabète et ses complications. En effet de nombreux arguments, principalement expérimentaux, ont montré une implication du SKK dans la régulation et la survenue des processus conduisant aux troubles métaboliques du diabète de type 2 mais également à ses complications macro et microangiopathiques. Les liens entre SKK et diabète ont souvent été mis en évidence grâce à l'action des IEC qui, de par leur action inhibitrice sur l'ECA, inhibent le SRA et activent le SKK. Il semble en effet évident qu'une partie des effets bénéfiques des traitements par IEC soit liée à l'activation du SKK notamment dans la néphropathie diabétique, l'ischémie-reperfusion cardiaque et l'ischémie périphérique. Cependant, l'activation du SKK par les IEC est limitée par le fait que les IEC peuvent uniquement potentialiser l'effet des kinines endogènes alors que la

production de kinines endogènes est lente et faible. En effet, l'activité de la kallibréine tissulaire est faible au niveau artériel et est un facteur limitant l'action des kinines même après traitement par IEC. L'activation directe du SKK et notamment l'activation spécifique du B2R pourrait donc être une nouvelle voie thérapeutique dans la prise en charge des complications du diabète. Il est à noter également que l'utilisation d'agonistes spécifiques de chaque récepteur permet de mieux comprendre l'action et le rôle de chacun des récepteurs du SKK dans les processus physiopathologiques étudiés. En effet, la plupart des connaissances sur le rôle du SKK et de ses récepteurs est basée sur des expérimentations utilisant des modèles d'inactivation pharmacologique ou génétique du système. Or, l'inactivation d'un récepteur induit une régulation compensatrice de l'autre conduisant à une difficulté d'interprétation des résultats. Le développement et l'utilisation de modèle d'inactivation génétique de la TK a permis la limitation de ce biais d'étude puisque les animaux déficient pour le gène de la TK ne produisent pas de kinines empêchant ainsi toute activation du SKK.

Nous avons dans ce travail pu étudier le rôle du SKK dans deux modèles, un modèle d'inactivation génétique du SKK par déficience en TK et un modèle original d'activation pharmacologique par des agonistes spécifiques de chaque récepteur.

SKK et métabolisme glucidique

Le modèle d'inactivation génétique complète du SKK a été utilisé pour étudier le rôle du SKK dans le métabolisme glucidique. Nos résultats négatifs contrastent avec l'hypothèse de départ d'un rôle bénéfique du SKK dans le développement du diabète. La plupart des études expérimentales ont en effet montré un rôle positif du SKK dans l'homéostasie glucidique. De même cliniquement, les essais randomisés utilisant des IEC (116-118) ont montré un effet protecteur du traitement sur le risque de diabète de type 2. Cependant, même si nos résultats contrastent avec ceux de la littérature, il faut souligner que nos travaux ont été réalisés dans

plusieurs modèles d'études. Ainsi, nos résultats sont concordants dans deux modèles murins de diabète de type 2 et d'insulinorésistance (environnemental et génétique) et une cohorte humaine de grande taille avec un suivi de 9 ans. Le polymorphisme de la TK étudié dans la cohorte DESIR a quant à lui une conséquence biologique et fonctionnelle puisqu'il a été bien montré qu'il conduit à une diminution de la production de kinines associée à un phénotype vasculaire pathologique. De plus, très peu d'études ont étudié le polymorphisme des acteurs du SKK sur l'incidence des troubles métabolique chez l'homme. Nos données montrent donc que la déficience en TK n'a pas d'incidence sur le métabolisme glucidique et le risque de diabète. Ceci suggère l'absence de rôle du SKK dans les troubles métaboliques du diabète de type 2. Les différences avec les résultats disponibles peuvent s'expliquer au moins en partie par la différence avec les modèles utilisés notamment dans les modèles génétiques d'inactivation des récepteurs.

Il est à noter cependant que nous avons étudié ici le métabolisme glucidique de manière relativement superficielle. Il n'est pas impossible que des anomalies plus fines, sans véritable conséquence fonctionnelle sur la glycémie, la tolérance au glucose ou à l'insuline, soient présentes chez les souris TK $-/-$. Cependant, la pertinence clinique ou physiologique de délétion génique complète sans conséquence phénotypique peut être discutable. Il est également possible que la durée d'étude des souris sous régime gras n'ait pas été assez longue ou que les souris ob/ob n'aient pas été assez âgées au moment de l'étude. Cependant, la durée d'étude sous régime gras a permis d'induire une différence de poids et de trouble métabolique en comparaison aux souris sous régime standard. De même, une expérience supplémentaire des souris ob/ob plus âgées (6 mois à 12 mois) n'a pas permis de mettre en évidence de différence entre les génotypes.

Une limite de notre étude est l'absence de vérification de production de kinines chez les animaux TK $-/-$ et notamment dans les organes impliqués dans le métabolisme glucidique

(foie, pancréas, rein, tissu adipeux,...). Cependant la première étude ayant décrit ces animaux a montré une très faible concentration de bradykinine dans le cœur et le rein des souris TK-/- et l'absence d'activité kallicréine (mesurée par la capacité à former des kinines) dans de nombreux autres organes (rein, colon, pancréas, glandes salivaires) suggérant l'absence de production de kinines chez ces animaux.

Une autre limite de l'étude est également le faible nombre de sujets homozygotes dans la population humaine ne permettant pas une analyse statistique des données issues de cette population. Cependant l'étude des sujets hétérozygotes reste pertinente puisque le polymorphisme étudié a une conséquence biologique et phénotypique (159, 160).

En conclusion, malgré une hypothèse de départ différente, nos résultats suggèrent que la kallicréine tissulaire n'est pas impliquée dans les troubles du métabolisme glucidique observé lors de l'obésité et le diabète de type 2 aussi bien chez la souris que chez l'homme. Ces résultats demandent évidemment confirmation et pourraient être complétés par des études de stimulation du système.

SKK et ischémie reperfusion cardiaque

Nous avons étudié dans ce travail pour la première fois, l'effet de l'activation directe des récepteurs des kinines sur les lésions d'IR cardiaque chez la souris diabétique et non diabétique. La stimulation directe et spécifique de chaque récepteur a pu être réalisée par la synthèse récente par une équipe universitaire de deux agonistes peptidiques puissants, sélectifs et résistants à la dégradation peptidique (241 , 242).

Les données de la littérature et notamment les travaux réalisés au sein de l'équipe sont en faveur d'un rôle majeur du SKK dans les mécanismes de pré et postconditionnement cardiaque. Il a été montré que l'effet cardioprotecteur du SKK est principalement lié à l'action de B2R. Notre résultat obtenu chez les souris non diabétiques avec l'agoniste B2R confirme

donc les données de la littérature. Nos travaux ont cependant l'originalité d'avoir étudié l'activation directe du récepteur alors que les données disponibles utilisaient des modèles d'inhibition pharmacologique ou génétique du récepteur. Nous avons également ainsi pu mettre en évidence l'absence d'effet de l'activation du B1R lors de l'IR chez les animaux non diabétiques.

Les résultats les plus originaux sont ceux obtenus chez les animaux diabétiques. Tout d'abord, nous confirmons les données montrant une perte de l'effet cardioprotecteur du PostC lors du diabète. En effet ni le PostC ischémique, ni le Ramiprilat ne permettent d'induire de diminution de taille de l'infarctus alors qu'ils étaient tous deux efficaces chez les animaux non diabétiques. Nous observons surtout que l'administration intraveineuse de l'agoniste B1R juste au moment de la reperfusion permet de limiter la taille de l'infarctus chez les animaux diabétiques et donc que la stimulation du B1R permet de vaincre la résistance au PostC induit par le diabète. Ces effets bénéfiques sont associés à l'activation de la voie RISK, à la fois la voie des MAPK et PI3K/Akt.

Nous n'apportons pas ici d'explication aux mécanismes par lesquels le diabète entraîne une résistance au PostC. Nous constatons seulement que les voies de signalisation intracellulaire ne sont pas activées suggérant un problème de signalisation en amont (activation des récepteurs, liaison,...). Les raisons pour lesquelles l'agoniste B1 permet de diminuer la taille de l'infarctus lors du diabète ne sont que partiellement expliquées. Nous constatons en effet une induction de l'expression de B1R dans le cœur des souris diabétiques. Cependant, nous n'expliquons pas pourquoi la stimulation du récepteur active les voies de signalisation cardioprotectrice. Il est possible qu'il existe un effet seuil lors du diabète nécessitant une plus forte stimulation des récepteurs pour activer les voies de signalisation intracellulaire. Le fait que le B1R ne soit pas internalisé après liaison à son ligand et que de

fortes doses d'agoniste n'ait pas d'effet secondaire délétère permet de stimuler plus fortement le récepteur et donc de dépasser cet effet seuil. Ceci reste cependant une hypothèse.

Le PostC a été testé en clinique et il semble y avoir des résultats prometteurs (208 , 209). L'effet de ces traitements n'a cependant pas été évalué spécifiquement chez le diabétique et la notion de résistance au PostC chez l'homme n'est pas confirmée. Cependant, l'activation des récepteurs des kinines peut être une piste thérapeutique nouvelle dans la prise en charge des patients atteints de syndrome coronarien aigu, notamment chez les patients diabétiques avec l'agoniste B1R.

L'utilisation des agonistes des kinines en clinique posera bien évidemment la question de leurs éventuelles effets secondaires. Le premier d'entre eux est l'effet hypotenseur que nous avons mis en évidence pour l'agoniste B2 dans nos expériences préliminaires. Cependant cet effet est facilement contrôlable par un ajustement de doses semblable à tout traitement pharmacologique. Il existe ensuite un risque de toux semblable à celui observé avec les IEC puisque la toux sous IEC serait due à une accumulation de kinines au niveau des voies aériennes supérieures. Cependant, les mécanismes exacts de la toux sous IEC ne sont pas complètement compris et les IEC augmentent également le taux d'autres peptides qui pourraient être impliqués dans cet effet secondaire notamment la substance P. Un autre effet secondaire potentiellement plus préoccupant est celui des angiooedèmes. En effet les kinines à de fortes concentrations peuvent induire des œdèmes, plus particulièrement chez les patients porteurs d'une déficience en inhibiteur de la C1 estérase. Il semble que les deux récepteurs des kinines soient impliqués dans la survenue d'œdème (252). Cependant, les angiooedèmes observés sous IEC sont rares (environ 0.2% des patients dans les essais cliniques). Dans nos travaux, il n'a pas été mis en évidence d'angiooedèmes chez aucune des souris traitées par les agonistes. De plus il est possible qu'un ajustement de dose suffise à les éviter. Comme vu en introduction, le SKK joue un rôle au niveau rénal, neurologique et oculaire. L'effet des

agonistes sur ces tissus est inconnu mais aucun effet délétère particulier sur ceux-ci n'a été mentionné chez les patients sous IEC. Il est à noter également qu'il est possible qu'il existe des différences d'effets selon le type d'administration aiguë ou chronique. Un traitement aigu et unique comme utilisé dans notre protocole a probablement moins de chance d'avoir des effets délétères.

Cependant l'activation chronique des récepteurs des kinines pourrait avoir des effets contradictoires en fonction des organes et des pathologies. On a vu qu'il était probable que la stimulation du B2R ait des effets bénéfiques dans la néphropathie diabétique. L'effet de la stimulation du B1R pourrait lui avoir des effets plutôt délétères dans cette pathologie. Par ailleurs, des travaux en cours au sein du laboratoire ont montré qu'un traitement chronique par l'agoniste B2R, mais également par le B1R, avait un effet bénéfique dans un modèle d'ischémie des membres inférieurs chez la souris diabétique. Au contraire, l'agoniste B2R aurait des effets délétères dans les mécanismes de cicatrisation chez la souris diabétique. Il semble également que la stimulation du SKK pourrait être délétère dans la rétinopathie diabétique. Le développement des agonistes des kinines comme thérapeutique dans le diabète nécessite donc une évaluation rigoureuse de l'ensemble des effets potentiels, délétères ou bénéfiques, attendus ou non.

Le développement récent d'agonistes spécifiques des kinines est donc une nouvelle voie thérapeutique prometteuse notamment pour le traitement des pathologies coronariennes aiguës. Nous avons ainsi déposé une demande de brevet pour l'utilisation de ces agonistes dans l'ischémie reperfusion cardiaque. Au vu de l'implication du SKK dans les autres complications du diabète, il reste à tester ces molécules dans le développement de celles-ci et notamment dans la néphropathie diabétique, l'ischémie cardiaque chronique ou la cardiopathie diabétique. En plus de leur potentiel thérapeutique, ces agonistes représentent un moyen de mieux comprendre le rôle du SKK dans divers processus physiopathologiques.

CHAPITRE VIII : CONCLUSION GENERALE

Le diabète est une maladie de plus en plus fréquente, dont la gravité est liée aux complications qui sont multiples. L'amélioration du traitement du diabète passe par une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques et des systèmes de régulation impliqués à la fois dans la genèse de la maladie et dans celle de ses complications. Cette meilleure connaissance permet et permettra le développement de nouvelles stratégies de prévention et de traitement du diabète et de ces complications.

Le but de ce travail était de mieux comprendre l'implication du SKK dans la survenue des anomalies métaboliques du diabète et dans les complications cardiaques d'une hyperglycémie chronique. Nous avons utilisé pour répondre à chaque question des approches originales et innovantes. Concernant le rôle du SKK dans le métabolisme glucidique et l'insulinorésistance, alors que notre hypothèse de départ, tirée des données de la littérature, était en faveur d'un rôle plutôt bénéfique, nous ne mettons pas en évidence d'effet de la déficience génétique en TK, principal activateur du système, et ce dans des études animales et humaines. En revanche, nous mettons en évidence un effet cardioprotecteur de l'activation du B2R ou du B1R respectivement en l'absence ou en présence de diabète. Ces résultats qui utilisent pour la première fois des agonistes des récepteurs des kinines sont particulièrement intéressants dans nos modèles diabétiques. A la fois parce qu'ils mettent en avant un rôle méconnu du B1R mais aussi car les traitements cardioprotecteurs font souvent défaut lors du diabète du fait d'une résistance aux mécanismes encore mal compris.

L'ensemble de ce travail éclaire à la fois la physiologie du SKK et du diabète. Nos résultats négatifs, bien que répliqués dans plusieurs modèles, demandent confirmation,

notamment sur le rôle respectif de chaque récepteur. L'étude des agonistes des kinines offre de nouvelles pistes thérapeutiques dans la prise en charge du patient diabétique. Dans l'ischémie reperfusion comme nous l'avons montré, mais également dans l'ensemble des complications du diabète. De futures études permettront de tester l'effet de ces agonistes dans des modèles d'ischémie cardiaque chronique et de cardiopathie diabétique, cardiopathie métabolique liée à l'hyperglycémie chronique. Ces nouvelles études permettront à la fois de mieux comprendre le rôle du SKK et de ses récepteurs dans ces complications et d'avancer dans le développement de cette voie thérapeutique.

REFERENCES

1. Kuoppala A, Lindstedt KA, Saarinen J, Kovanen PT, Kokkonen JO. Inactivation of bradykinin by angiotensin-converting enzyme and by carboxypeptidase N in human plasma. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2000;278(4):H1069-74. Epub 2000/04/06.
2. Kroneberg G, Stoepel K. [Effect of alpha-methyl-dopa on the action of tyramine in cats pretreated with reserpine]. *Experientia*. 1963;19:252-3. Epub 1963/05/15.
3. Sheikh IA, Kaplan AP. Studies of the digestion of bradykinin, Lys-bradykinin, and des-Arg9-bradykinin by angiotensin converting enzyme. *Biochemical pharmacology*. 1986;35(12):1951-6. Epub 1986/06/15.
4. Jaspard E, Wei L, Alhenc-Gelas F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(13):9496-503. Epub 1993/05/05.
5. Gafford JT, Skidgel RA, Erdos EG, Hersh LB. Human kidney "enkephalinase", a neutral metalloendopeptidase that cleaves active peptides. *Biochemistry*. 1983;22(13):3265-71. Epub 1983/06/21.
6. Kerr MA, Kenny AJ. The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *The Biochemical journal*. 1974;137(3):477-88. Epub 1974/03/01.
7. Decarie A, Raymond P, Gervais N, Couture R, Adam A. Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg9]BK: influence of enalaprilat. *The American journal of physiology*. 1996;271(4 Pt 2):H1340-7. Epub 1996/10/01.
8. Farmer SG. *The Kinin system*. San Diego: Academic Press; 1997. xx, 349 p. p.
9. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacological reviews*. 2005;57(1):27-77. Epub 2005/03/01.
10. Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F, Adam A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *Journal of pharmacological sciences*. 2005;99(1):6-38. Epub 2005/09/24.
11. Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacological reviews*. 1992;44(1):1-80. Epub 1992/03/01.

12. Faussner A, Heinz-Erian P, Klier C, Roscher AA. Solubilization and characterization of B2 bradykinin receptors from cultured human fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(15):9442-6. Epub 1991/05/25.
13. Pizard A, Blaukat A, Muller-Esterl W, Alhenc-Gelas F, Rajerison RM. Bradykinin-induced internalization of the human B2 receptor requires phosphorylation of three serine and two threonine residues at its carboxyl tail. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(18):12738-47. Epub 1999/04/23.
14. Bachvarov DR, Houle S, Bachvarova M, Bouthillier J, Adam A, Marceau F. Bradykinin B(2) receptor endocytosis, recycling, and down-regulation assessed using green fluorescent protein conjugates. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2001;297(1):19-26. Epub 2001/03/22.
15. Blaukat A, Micke P, Kalatskaya I, Faussner A, Muller-Esterl W. Downregulation of bradykinin B2 receptor in human fibroblasts during prolonged agonist exposure. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2003;284(6):H1909-16. Epub 2003/05/14.
16. Pesquero JB, Lindsey CJ, Paiva AC, Ganten D, Bader M. Transcriptional regulatory elements in the rat bradykinin B2 receptor gene. *Immunopharmacology*. 1996;33(1-3):36-41. Epub 1996/06/01.
17. Schmidlin F, Scherrer D, Daeffler L, Bertrand C, Landry Y, Gies JP. Interleukin-1beta induces bradykinin B2 receptor gene expression through a prostanoid cyclic AMP-dependent pathway in human bronchial smooth muscle cells. *Molecular pharmacology*. 1998;53(6):1009-15. Epub 1998/06/17.
18. Lung CC, Jagels MA, Daffern PJ, Tan EM, Zuraw BL. Induction of human B2 bradykinin receptor mRNA and membrane receptors by IFNgamma. *Immunopharmacology*. 1998;39(3):243-53. Epub 1998/10/01.
19. Newton R, Eddleston J, Haddad el B, Hawisa S, Mak J, Lim S, et al. Regulation of kinin receptors in airway epithelial cells by inflammatory cytokines and dexamethasone. *European journal of pharmacology*. 2002;441(3):193-202. Epub 2002/06/14.
20. Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. The B1 receptors for kinins. *Pharmacological reviews*. 1998;50(3):357-86. Epub 1998/10/02.
21. Marceau F. Kinin B1 receptors: a review. *Immunopharmacology*. 1995;30(1):1-26. Epub 1995/06/01.
22. Medeiros R, Cabrini DA, Ferreira J, Fernandes ES, Mori MA, Pesquero JB, et al. Bradykinin B1 receptor expression induced by tissue damage in the rat portal vein: a critical

role for mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB signaling pathways. *Circulation research*. 2004;94(10):1375-82. Epub 2004/04/17.

23. Campos MM, Souza GE, Calixto JB. In vivo B1 kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor kappaB pathways. *British journal of pharmacology*. 1999;127(8):1851-9. Epub 1999/09/14.

24. Duchene J, Lecomte F, Ahmed S, Cayla C, Pesquero J, Bader M, et al. A novel inflammatory pathway involved in leukocyte recruitment: role for the kinin B1 receptor and the chemokine CXCL5. *J Immunol*. 2007;179(7):4849-56. Epub 2007/09/20.

25. Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, Stucky CL, Silva JA, Jr., Walther T, et al. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(14):8140-5. Epub 2000/06/22.

26. Blaukat A, Herzer K, Schroeder C, Bachmann M, Nash N, Muller-Esterl W. Overexpression and functional characterization of kinin receptors reveal subtype-specific phosphorylation. *Biochemistry*. 1999;38(4):1300-9. Epub 1999/02/04.

27. Tropea MM, Gummelt D, Herzig MS, Leeb-Lundberg LM. B1 and B2 kinin receptors on cultured rabbit superior mesenteric artery smooth muscle cells: receptor-specific stimulation of inositol phosphate formation and arachidonic acid release by des-Arg9-bradykinin and bradykinin. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1993;264(2):930-7. Epub 1993/02/01.

28. Patterson CC, Gyurus E, Rosenbauer J, Cinek O, Neu A, Schober E, et al. Trends in childhood type 1 diabetes incidence in Europe during 1989-2008: evidence of non-uniformity over time in rates of increase. *Diabetologia*. 2012;55(8):2142-7. Epub 2012/05/29.

29. Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*. 2010;464(7293):1293-300. Epub 2010/05/01.

30. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006;444(7121):840-6. Epub 2006/12/15.

31. Vincent AM, Callaghan BC, Smith AL, Feldman EL. Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets. *Nature reviews Neurology*. 2011;7(10):573-83. Epub 2011/09/14.

32. Standards of medical care in diabetes--2013. *Diabetes care*. 2013;36 Suppl 1:S11-66. Epub 2013/01/04.

33. Rask-Madsen C, King GL. Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell metabolism*. 2013;17(1):20-33. Epub 2013/01/15.

34. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20. Epub 2001/12/14.
35. Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *The Journal of clinical investigation*. 1994;93(6):2431-7. Epub 1994/06/01.
36. Kawano H, Do YS, Kawano Y, Starnes V, Barr M, Law RE, et al. Angiotensin II has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts. *Circulation*. 2000;101(10):1130-7. Epub 2000/03/15.
37. Erbay E, Babaev VR, Mayers JR, Makowski L, Charles KN, Snitow ME, et al. Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. *Nature medicine*. 2009;15(12):1383-91. Epub 2009/12/08.
38. Zhong Y, Li J, Chen Y, Wang JJ, Ratan R, Zhang SX. Activation of endoplasmic reticulum stress by hyperglycemia is essential for Muller cell-derived inflammatory cytokine production in diabetes. *Diabetes*. 2012;61(2):492-504. Epub 2012/01/10.
39. Antonetti DA, Klein R, Gardner TW. Diabetic retinopathy. *The New England journal of medicine*. 2012;366(13):1227-39. Epub 2012/03/30.
40. Klausen K, Borch-Johnsen K, Feldt-Rasmussen B, Jensen G, Clausen P, Scharling H, et al. Very low levels of microalbuminuria are associated with increased risk of coronary heart disease and death independently of renal function, hypertension, and diabetes. *Circulation*. 2004;110(1):32-5. Epub 2004/06/24.
41. Mogensen CE, Christensen CK, Vittinghus E. The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes*. 1983;32 Suppl 2:64-78. Epub 1983/05/01.
42. Dronavalli S, Duka I, Bakris GL. The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*. 2008;4(8):444-52. Epub 2008/07/09.
43. Marre M, Bernadet P, Gallois Y, Savagner F, Guyene TT, Hallab M, et al. Relationships between angiotensin I converting enzyme gene polymorphism, plasma levels, and diabetic retinal and renal complications. *Diabetes*. 1994;43(3):384-8. Epub 1994/03/01.
44. Doria A, Warram JH, Krolewski AS. Genetic predisposition to diabetic nephropathy. Evidence for a role of the angiotensin I--converting enzyme gene. *Diabetes*. 1994;43(5):690-5. Epub 1994/05/01.
45. Marre M, Jeunemaitre X, Gallois Y, Rodier M, Chatellier G, Sert C, et al. Contribution of genetic polymorphism in the renin-angiotensin system to the development of

renal complications in insulin-dependent diabetes: Genetique de la Nephropathie Diabetique (GENEDIAB) study group. *The Journal of clinical investigation*. 1997;99(7):1585-95. Epub 1997/04/01.

46. Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2002;287(19):2570-81. Epub 2002/05/22.

47. Dietze G, Maerker E, Lodri C, Schiffman R, Wicklmayr M, Geiger R, et al. Possible involvement of kinins in muscle energy metabolism. *Advances in experimental medicine and biology*. 1984;167:63-71. Epub 1984/01/01.

48. Ma JX, Song Q, Hatcher HC, Crouch RK, Chao L, Chao J. Expression and cellular localization of the kallikrein-kinin system in human ocular tissues. *Experimental eye research*. 1996;63(1):19-26. Epub 1996/07/01.

49. Abdouh M, Khanjari A, Abdelazziz N, Ongali B, Couture R, Hassessian HM. Early upregulation of kinin B1 receptors in retinal microvessels of the streptozotocin-diabetic rat. *British journal of pharmacology*. 2003;140(1):33-40. Epub 2003/09/12.

50. Pouliot M, Hetu S, Lahjouji K, Couture R, Vaucher E. Modulation of retinal blood flow by kinin B(1) receptor in Streptozotocin-diabetic rats. *Experimental eye research*. 2011;92(6):482-9. Epub 2011/03/23.

51. Catanzaro O, Labal E, Andornino A, Capponi JA, Di Martino I, Sirois P. Blockade of early and late retinal biochemical alterations associated with diabetes development by the selective bradykinin B1 receptor antagonist R-954. *Peptides*. 2012;34(2):349-52. Epub 2012/03/01.

52. Ebrahimian TG, Tamarat R, Clergue M, Duriez M, Levy BI, Silvestre JS. Dual effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on angiogenesis in type 1 diabetic mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25(1):65-70. Epub 2004/11/06.

53. Nakamura S, Morimoto N, Tsuruma K, Izuta H, Yasuda Y, Kato N, et al. Tissue kallikrein inhibits retinal neovascularization via the cleavage of vascular endothelial growth factor-165. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(5):1041-8. Epub 2011/02/05.

54. Pinna A, Emanuelli C, Dore S, Salvo M, Madeddu P, Carta F. Levels of human tissue kallikrein in the vitreous fluid of patients with severe proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmologica Journal international d'ophtalmologie International journal of ophthalmology Zeitschrift fur Augenheilkunde*. 2004;218(4):260-3. Epub 2004/07/20.

55. Gao BB, Chen X, Timothy N, Aiello LP, Feener EP. Characterization of the vitreous proteome in diabetes without diabetic retinopathy and diabetes with proliferative diabetic retinopathy. *Journal of proteome research*. 2008;7(6):2516-25. Epub 2008/04/25.
56. Gao BB, Clermont A, Rook S, Fonda SJ, Srinivasan VJ, Wojtkowski M, et al. Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. *Nature medicine*. 2007;13(2):181-8. Epub 2007/01/30.
57. Chaturvedi N, Sjolie AK, Stephenson JM, Abrahamian H, Keipes M, Castellarin A, et al. Effect of lisinopril on progression of retinopathy in normotensive people with type 1 diabetes. The EUCLID Study Group. EURODIAB Controlled Trial of Lisinopril in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Lancet*. 1998;351(9095):28-31. Epub 1998/01/20.
58. Beulens JW, Patel A, Vingerling JR, Cruickshank JK, Hughes AD, Stanton A, et al. Effects of blood pressure lowering and intensive glucose control on the incidence and progression of retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomised controlled trial. *Diabetologia*. 2009;52(10):2027-36. Epub 2009/07/28.
59. Phipps JA, Feener EP. The kallikrein-kinin system in diabetic retinopathy: lessons for the kidney. *Kidney international*. 2008;73(10):1114-9. Epub 2008/02/15.
60. Clermont A, Chilcote TJ, Kita T, Liu J, Riva P, Sinha S, et al. Plasma kallikrein mediates retinal vascular dysfunction and induces retinal thickening in diabetic rats. *Diabetes*. 2011;60(5):1590-8. Epub 2011/03/30.
61. Vio CP, Loyola S, Velarde V. Localization of components of the kallikrein-kinin system in the kidney: relation to renal function. State of the art lecture. *Hypertension*. 1992;19(2 Suppl):II10-6. Epub 1992/02/01.
62. Bascands JL, Pecher C, Cabos G, Girolami JP. B2-kinin receptor like binding in rat glomerular membranes. *Biochemical and biophysical research communications*. 1989;158(1):99-104. Epub 1989/01/16.
63. Ardaillou N, Blaise V, Costenbader K, Vassitch Y, Ardaillou R. Characterization of a B2-bradykinin receptor in human glomerular podocytes. *The American journal of physiology*. 1996;271(3 Pt 2):F754-61. Epub 1996/09/01.
64. Figueroa CD, Gonzalez CB, Grigoriev S, Abd Alla SA, Haasemann M, Jarnagin K, et al. Probing for the bradykinin B2 receptor in rat kidney by anti-peptide and anti-ligand antibodies. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1995;43(2):137-48. Epub 1995/02/01.

65. Marin-Castano ME, Schanstra JP, Praddaude F, Pesquero JB, Ader JL, Girolami JP, et al. Differential induction of functional B1-bradykinin receptors along the rat nephron in endotoxin induced inflammation. *Kidney international*. 1998;54(6):1888-98. Epub 1998/12/16.
66. Bodin S, Chollet C, Goncalves-Mendes N, Gardes J, Pean F, Heudes D, et al. Kallikrein protects against microalbuminuria in experimental type I diabetes. *Kidney international*. 2009;76(4):395-403.
67. Zatz R, Dunn BR, Meyer TW, Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *The Journal of clinical investigation*. 1986;77(6):1925-30. Epub 1986/06/01.
68. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *The New England journal of medicine*. 1993;329(20):1456-62. Epub 1993/11/11.
69. Randomised placebo-controlled trial of lisinopril in normotensive patients with insulin-dependent diabetes and normoalbuminuria or microalbuminuria. The EUCLID Study Group. *Lancet*. 1997;349(9068):1787-92. Epub 1997/06/21.
70. Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *Lancet*. 2000;355(9200):253-9. Epub 2000/02/16.
71. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *The Journal of clinical investigation*. 1990;86(4):1343-6. Epub 1990/10/01.
72. Costerousse O, Jaspard E, Wei L, Corvol P, Alhenc-Gelas F. The angiotensin I-converting enzyme (kininase II): molecular organization and regulation of its expression in humans. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1992;20 Suppl 9:S10-5. Epub 1992/01/01.
73. Hallab M, Berrut G, Bouhanick B, Bled F, Suraniti S, Girault A, et al. [Increase of activity of angiotensin-converting enzyme in insulin-dependent diabetic patients with permanent microalbuminuria]. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux*. 1992;85(8):1185-8. Epub 1992/08/01. Elevation de l'activite de l'enzyme de conversion chez des diabetiques insulino-dependants presentant une microalbuminurie permanente.
74. Lieberman J, Sastre A. Serum angiotensin-converting enzyme: elevations in diabetes mellitus. *Annals of internal medicine*. 1980;93(6):825-6. Epub 1980/12/01.

75. Tarnow L, Cambien F, Rossing P, Nielsen FS, Hansen BV, Lecerf L, et al. Lack of relationship between an insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene and diabetic nephropathy and proliferative retinopathy in IDDM patients. *Diabetes*. 1995;44(5):489-94. Epub 1995/05/01.
76. Schmidt S, Schone N, Ritz E. Association of ACE gene polymorphism and diabetic nephropathy? The Diabetic Nephropathy Study Group. *Kidney international*. 1995;47(4):1176-81. Epub 1995/04/01.
77. Fujisawa T, Ikegami H, Kawaguchi Y, Hamada Y, Ueda H, Shintani M, et al. Meta-analysis of association of insertion/deletion polymorphism of angiotensin I-converting enzyme gene with diabetic nephropathy and retinopathy. *Diabetologia*. 1998;41(1):47-53. Epub 1998/03/14.
78. Ng DP, Tai BC, Koh D, Tan KW, Chia KS. Angiotensin-I converting enzyme insertion/deletion polymorphism and its association with diabetic nephropathy: a meta-analysis of studies reported between 1994 and 2004 and comprising 14,727 subjects. *Diabetologia*. 2005;48(5):1008-16. Epub 2005/04/15.
79. Boright AP, Paterson AD, Mirea L, Bull SB, Mowjoodi A, Scherer SW, et al. Genetic variation at the ACE gene is associated with persistent microalbuminuria and severe nephropathy in type 1 diabetes: the DCCT/EDIC Genetics Study. *Diabetes*. 2005;54(4):1238-44. Epub 2005/03/29.
80. Hadjadj S, Tarnow L, Forsblom C, Kazeem G, Marre M, Groop PH, et al. Association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms and diabetic nephropathy: case-control, haplotype, and family-based study in three European populations. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007;18(4):1284-91. Epub 2007/03/23.
81. Barnas U, Schmidt A, Illievich A, Kiener HP, Rabensteiner D, Kaider A, et al. Evaluation of risk factors for the development of nephropathy in patients with IDDM: insertion/deletion angiotensin converting enzyme gene polymorphism, hypertension and metabolic control. *Diabetologia*. 1997;40(3):327-31. Epub 1997/03/01.
82. Huang W, Gallois Y, Bouby N, Bruneval P, Heudes D, Belair MF, et al. Genetically increased angiotensin I-converting enzyme level and renal complications in the diabetic mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(23):13330-4. Epub 2001/11/01.
83. Feng Y, Niu T, Xu X, Chen C, Li Q, Qian R, et al. Insertion/deletion polymorphism of the ACE gene is associated with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51(6):1986-8. Epub 2002/05/29.

84. Fujisawa T, Ikegami H, Shen GQ, Yamato E, Takekawa K, Nakagawa Y, et al. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism is associated with myocardial infarction, but not with retinopathy or nephropathy, in NIDDM. *Diabetes care*. 1995;18(7):983-5. Epub 1995/07/01.
85. Grammer TB, Renner W, von Karger S, Boehm BO, Winkelmann BR, Maerz W. The angiotensin-I converting enzyme I/D polymorphism is not associated with type 2 diabetes in individuals undergoing coronary angiography. (The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study). *Molecular genetics and metabolism*. 2006;88(4):378-83. Epub 2006/06/13.
86. Buleon M, Allard J, Jaafar A, Praddaude F, Dickson Z, Ranera MT, et al. Pharmacological blockade of B2-kinin receptor reduces renal protective effect of angiotensin-converting enzyme inhibition in db/db mice model. *American journal of physiology Renal physiology*. 2008;294(5):F1249-56. Epub 2008/03/28.
87. Murphey LJ, Gainer JV, Vaughan DE, Brown NJ. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism modulates the human in vivo metabolism of bradykinin. *Circulation*. 2000;102(8):829-32. Epub 2000/08/23.
88. Takahashi N, Hagaman JR, Kim HS, Smithies O. Minireview: computer simulations of blood pressure regulation by the renin-angiotensin system. *Endocrinology*. 2003;144(6):2184-90. Epub 2003/05/15.
89. Buleon M, Mehrenberger M, Pecher C, Praddaude F, Couture R, Tack I, et al. [New perspectives for bradykinin in nephroprotection]. *Medecine sciences : M/S*. 2007;23(12):1141-7. Epub 2007/12/25. Bradykinine et nephroprotection: pourquoi? comment? Perspectives.
90. Li P, Chappell MC, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin-(1-7) augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide. *Hypertension*. 1997;29(1 Pt 2):394-400. Epub 1997/01/01.
91. Chen Z, Tan F, Erdos EG, Deddish PA. Hydrolysis of angiotensin peptides by human angiotensin I-converting enzyme and the resensitization of B2 kinin receptors. *Hypertension*. 2005;46(6):1368-73. Epub 2005/10/26.
92. Chen Z, Deddish PA, Minshall RD, Becker RP, Erdos EG, Tan F. Human ACE and bradykinin B2 receptors form a complex at the plasma membrane. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;20(13):2261-70. Epub 2006/11/02.
93. Kakoki M, Sullivan KA, Backus C, Hayes JM, Oh SS, Hua K, et al. Lack of both bradykinin B1 and B2 receptors enhances nephropathy, neuropathy, and bone mineral loss in

Akita diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(22):10190-5.

94. Kakoki M, Takahashi N, Jennette JC, Smithies O. Diabetic nephropathy is markedly enhanced in mice lacking the bradykinin B2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(36):13302-5. Epub 2004/08/25.

95. Tomita H, Sanford RB, Smithies O, Kakoki M. The kallikrein-kinin system in diabetic nephropathy. *Kidney international*. 2012;81(8):733-44. Epub 2012/02/10.

96. Alric C, Pecher C, Cellier E, Schanstra JP, Poirier B, Chevalier J, et al. Inhibition of IGF-I-induced Erk 1 and 2 activation and mitogenesis in mesangial cells by bradykinin. *Kidney international*. 2002;62(2):412-21. Epub 2002/07/12.

97. Blaes N, Pecher C, Mehrenberger M, Cellier E, Praddaude F, Chevalier J, et al. Bradykinin inhibits high glucose- and growth factor-induced collagen synthesis in mesangial cells through the B2-kinin receptor. *American journal of physiology Renal physiology*. 2012;303(2):F293-303. Epub 2012/05/11.

98. Pereira RL, Buscariollo BN, Correa-Costa M, Semedo P, Oliveira CD, Reis VO, et al. Bradykinin receptor 1 activation exacerbates experimental focal and segmental glomerulosclerosis. *Kidney international*. 2011;79(11):1217-27. Epub 2011/03/18.

99. Klein J, Gonzalez J, Decramer S, Bandin F, Neau E, Salant DJ, et al. Blockade of the kinin B1 receptor ameliorates glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010;21(7):1157-64. Epub 2010/05/08.

100. Mikrut K, Paluszak J, Kozlik J, Sosnowski P, Krauss H, Grzeskowiak E. The effect of bradykinin on the oxidative state of rats with acute hyperglycaemia. *Diabetes research and clinical practice*. 2001;51(2):79-85. Epub 2001/02/13.

101. Haller H, Ito S, Izzo JL, Jr., Januszewicz A, Katayama S, Menne J, et al. Olmesartan for the delay or prevention of microalbuminuria in type 2 diabetes. *The New England journal of medicine*. 2011;364(10):907-17. Epub 2011/03/11.

102. Liu YH, Yang XP, Sharov VG, Nass O, Sabbah HN, Peterson E, et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists in rats with heart failure. Role of kinins and angiotensin II type 2 receptors. *The Journal of clinical investigation*. 1997;99(8):1926-35. Epub 1997/04/15.

103. Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, Kurihara H, Murasawa S, Takai S, et al. Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *The Journal of clinical investigation*. 1999;104(7):925-35. Epub 1999/10/08.

104. Abadir PM, Periasamy A, Carey RM, Siragy HM. Angiotensin II type 2 receptor-bradykinin B2 receptor functional heterodimerization. *Hypertension*. 2006;48(2):316-22. Epub 2006/06/07.
105. Bergaya S, Hilgers RH, Meneton P, Dong Y, Bloch-Faure M, Inagami T, et al. Flow-dependent dilation mediated by endogenous kinins requires angiotensin AT2 receptors. *Circulation research*. 2004;94(12):1623-9. Epub 2004/05/08.
106. Hannan RE, Davis EA, Widdop RE. Functional role of angiotensin II AT2 receptor in modulation of AT1 receptor-mediated contraction in rat uterine artery: involvement of bradykinin and nitric oxide. *British journal of pharmacology*. 2003;140(5):987-95. Epub 2003/10/08.
107. Messadi-Laribi E, Griol-Charhbili V, Pizard A, Vincent MP, Heudes D, Meneton P, et al. Tissue kallikrein is involved in the cardioprotective effect of AT1-receptor blockade in acute myocardial ischemia. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2007;323(1):210-6. Epub 2007/07/20.
108. Levy D, Zochodne DW. Increased mRNA expression of the B1 and B2 bradykinin receptors and antinociceptive effects of their antagonists in an animal model of neuropathic pain. *Pain*. 2000;86(3):265-71. Epub 2000/05/17.
109. Dray A, Perkins M. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends in neurosciences*. 1993;16(3):99-104. Epub 1993/03/01.
110. Dray A. Kinins and their receptors in hyperalgesia. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1997;75(6):704-12. Epub 1997/06/01.
111. Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F. Kinin receptors in pain and inflammation. *European journal of pharmacology*. 2001;429(1-3):161-76. Epub 2001/11/08.
112. Talbot S, Couture R. Emerging role of microglial kinin B1 receptor in diabetic pain neuropathy. *Experimental neurology*. 2012;234(2):373-81. Epub 2011/12/14.
113. Calixto JB, Medeiros R, Fernandes ES, Ferreira J, Cabrini DA, Campos MM. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *British journal of pharmacology*. 2004;143(7):803-18. Epub 2004/11/03.
114. Torlone E, Rambotti AM, Perriello G, Botta G, Santeusano F, Brunetti P, et al. ACE-inhibition increases hepatic and extrahepatic sensitivity to insulin in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and arterial hypertension. *Diabetologia*. 1991;34(2):119-25. Epub 1991/02/01.
115. Vuorinen-Markkola H, Yki-Jarvinen H. Antihypertensive therapy with enalapril improves glucose storage and insulin sensitivity in hypertensive patients with non-insulin-

dependent diabetes mellitus. *Metabolism: clinical and experimental*. 1995;44(1):85-9. Epub 1995/01/01.

116. Bosch J, Lonn E, Pogue J, Arnold JM, Dagenais GR, Yusuf S. Long-term effects of ramipril on cardiovascular events and on diabetes: results of the HOPE study extension. *Circulation*. 2005;112(9):1339-46. Epub 2005/09/01.

117. Abuissa H, Jones PG, Marso SP, O'Keefe JH, Jr. Angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers for prevention of type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;46(5):821-6.

118. Bosch J, Yusuf S, Gerstein HC, Pogue J, Sheridan P, Dagenais G, et al. Effect of ramipril on the incidence of diabetes. *The New England journal of medicine*. 2006;355(15):1551-62. Epub 2006/09/19.

119. Bonnet F, Patel S, Laville M, Balkau B, Favuzzi A, Monti LD, et al. Influence of the ACE gene insertion/deletion polymorphism on insulin sensitivity and impaired glucose tolerance in healthy subjects. *Diabetes care*. 2008;31(4):789-94. Epub 2008/02/01.

120. Scheen AJ. Renin-angiotensin system inhibition prevents type 2 diabetes mellitus. Part 1. A meta-analysis of randomised clinical trials. *Diabetes & metabolism*. 2004;30(6):487-96. Epub 2005/01/27.

121. Henriksen EJ, Jacob S, Kinnick TR, Youngblood EB, Schmit MB, Dietze GJ. ACE inhibition and glucose transport in insulinresistant muscle: roles of bradykinin and nitric oxide. *The American journal of physiology*. 1999;277(1 Pt 2):R332-6. Epub 1999/07/17.

122. Shiuchi T, Cui TX, Wu L, Nakagami H, Takeda-Matsubara Y, Iwai M, et al. ACE inhibitor improves insulin resistance in diabetic mouse via bradykinin and NO. *Hypertension*. 2002;40(3):329-34. Epub 2002/09/07.

123. Fallo F, Mulatero P, Vettor R, Scarda A, Della Mea P, Morello F, et al. Bradykinin B2 receptor gene C-58T polymorphism and insulin resistance. A study on obese patients. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. 2004;36(4):243-6. Epub 2004/04/29.

124. Alvim Rde O, Santos PC, Nascimento RM, Coelho GL, Mill JG, Krieger JE, et al. BDKRB2 +9/-9 Polymorphism Is Associated with Higher Risk for Diabetes Mellitus in the Brazilian General Population. *Experimental diabetes research*. 2012;2012:480251.

125. Duka I, Shenouda S, Johns C, Kintsurashvili E, Gavras I, Gavras H. Role of the B(2) receptor of bradykinin in insulin sensitivity. *Hypertension*. 2001;38(6):1355-60. Epub 2001/12/26.

126. Araujo RC, Mori MA, Merino VF, Bascands JL, Schanstra JP, Zollner RL, et al. Role of the kinin B1 receptor in insulin homeostasis and pancreatic islet function. *Biological chemistry*. 2006;387(4):431-6. Epub 2006/04/12.
127. Barros CC, Haro A, Russo FJ, Schadock I, Almeida SS, Ribeiro RA, et al. Altered glucose homeostasis and hepatic function in obese mice deficient for both kinin receptor genes. *PloS one*. 2012;7(7):e40573.
128. Yang C, Hsu WH. Stimulatory effect of bradykinin on insulin release from the perfused rat pancreas. *The American journal of physiology*. 1995;268(5 Pt 1):E1027-30.
129. Damas J, Hallet C, Lefebvre PJ. Changes in blood glucose and plasma insulin levels induced by bradykinin in anaesthetized rats. *British journal of pharmacology*. 2001;134(6):1312-8.
130. Baron AD, Steinberg H, Brechtel G, Johnson A. Skeletal muscle blood flow independently modulates insulin-mediated glucose uptake. *The American journal of physiology*. 1994;266(2 Pt 1):E248-53.
131. Kohlman O, Jr., Neves Fde A, Ginoza M, Tavares A, Cezaretti ML, Zanella MT, et al. Role of bradykinin in insulin sensitivity and blood pressure regulation during hyperinsulinemia. *Hypertension*. 1995;25(5):1003-7.
132. Frossard M, Joukhadar C, Steffen G, Schmid R, Eichler HG, Muller M. Paracrine effects of angiotensin-converting-enzyme- and angiotensin-II-receptor- inhibition on transcapillary glucose transport in humans. *Life sciences*. 2000;66(10):PL147-54.
133. Kishi K, Muromoto N, Nakaya Y, Miyata I, Hagi A, Hayashi H, et al. Bradykinin directly triggers GLUT4 translocation via an insulin-independent pathway. *Diabetes*. 1998;47(4):550-8.
134. Beard KM, Lu H, Ho K, Fantus IG. Bradykinin augments insulin-stimulated glucose transport in rat adipocytes via endothelial nitric oxide synthase-mediated inhibition of Jun NH2-terminal kinase. *Diabetes*. 2006;55(10):2678-87.
135. Yuan G, Deng J, Wang T, Zhao C, Xu X, Wang P, et al. Tissue kallikrein reverses insulin resistance and attenuates nephropathy in diabetic rats by activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B and adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase signaling pathways. *Endocrinology*. 2007;148(5):2016-26.
136. Meneton P, Bloch-Faure M, Hagege AA, Ruetten H, Huang W, Bergaya S, et al. Cardiovascular abnormalities with normal blood pressure in tissue kallikrein-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(5):2634-9. Epub 2001/02/28.

137. Zhao C, Wang P, Xiao X, Chao J, Chao L, Wang DW, et al. Gene therapy with human tissue kallikrein reduces hypertension and hyperinsulinemia in fructose-induced hypertensive rats. *Hypertension*. 2003;42(5):1026-33. Epub 2003/10/22.
138. Montanari D, Yin H, Dobrzynski E, Agata J, Yoshida H, Chao J, et al. Kallikrein gene delivery improves serum glucose and lipid profiles and cardiac function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 2005;54(5):1573-80. Epub 2005/04/28.
139. Mori MA, Araujo RC, Reis FC, Sgai DG, Fonseca RG, Barros CC, et al. Kinin B1 receptor deficiency leads to leptin hypersensitivity and resistance to obesity. *Diabetes*. 2008;57(6):1491-500.
140. Dias JP, Couture R. Blockade of kinin B(1) receptor reverses plasma fatty acids composition changes and body and tissue fat gain in a rat model of insulin resistance. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2012;14(3):244-53.
141. Abe KC, Mori MA, Pesquero JB. Leptin deficiency leads to the regulation of kinin receptors expression in mice. *Regul Pept*. 2007;138(2-3):56-8.
142. Zuccollo A, Navarro M, Frontera M, Cueva F, Carattino M, Catanzaro OL. The involvement of kallikrein-kinin system in diabetes type I (insulinitis). *Immunopharmacology*. 1999;45(1-3):69-74. Epub 1999/12/30.
143. Catanzaro OL, Dziubecki D, Obregon P, Rodriguez RR, Sirois P. Antidiabetic efficacy of bradykinin antagonist R-954 on glucose tolerance test in diabetic type 1 mice. *Neuropeptides*. 2010;44(2):187-9. Epub 2010/01/23.
144. Marceau F, Sabourin T, Houle S, Fortin JP, Petitclerc E, Molinaro G, et al. Kinin receptors: functional aspects. *International immunopharmacology*. 2002;2(13-14):1729-39.
145. Ahluwalia A, Perretti M. B1 receptors as a new inflammatory target. Could this B the 1? *Trends in pharmacological sciences*. 1999;20(3):100-4.
146. Fonseca RG, Sales VM, Ropelle E, Barros CC, Oyama L, Ihara SS, et al. Lack of kinin B(1) receptor potentiates leptin action in the liver. *J Mol Med (Berl)*. 2013;91(7):851-60. Epub 2013/02/07.
147. Rothschild AM, Melo VL, Reis ML, Foss MC, Gallo L, Jr. Kininogen and prekallikrein increases in the blood of streptozotocin-diabetic rats are normalized by insulin in vivo and in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 1999;360(2):217-20.
148. Tschope C, Reinecke A, Seidl U, Yu M, Gavriluk V, Riester U, et al. Functional, biochemical, and molecular investigations of renal kallikrein-kinin system in diabetic rats. *The American journal of physiology*. 1999;277(6 Pt 2):H2333-40.

149. Boini KM, Zhang C, Xia M, Poklis JL, Li PL. Role of sphingolipid mediator ceramide in obesity and renal injury in mice fed a high-fat diet. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2010;334(3):839-46.
150. Yamamoto E, Dong YF, Kataoka K, Yamashita T, Tokutomi Y, Matsuba S, et al. Olmesartan prevents cardiovascular injury and hepatic steatosis in obesity and diabetes, accompanied by apoptosis signal regulating kinase-1 inhibition. *Hypertension*. 2008;52(3):573-80.
151. Belin de Chantemele EJ, Mintz JD, Rainey WE, Stepp DW. Impact of leptin-mediated sympatho-activation on cardiovascular function in obese mice. *Hypertension*. 2011;58(2):271-9.
152. Mark AL, Shaffer RA, Correia ML, Morgan DA, Sigmund CD, Haynes WG. Contrasting blood pressure effects of obesity in leptin-deficient ob/ob mice and agouti yellow obese mice. *Journal of hypertension*. 1999;17(12 Pt 2):1949-53.
153. Swoap SJ. Altered leptin signaling is sufficient, but not required, for hypotension associated with caloric restriction. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2001;281(6):H2473-9.
154. Christoffersen C, Bollano E, Lindegaard ML, Bartels ED, Goetze JP, Andersen CB, et al. Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice. *Endocrinology*. 2003;144(8):3483-90.
155. Symons JD, McMillin SL, Riehle C, Tanner J, Palionyte M, Hillas E, et al. Contribution of insulin and Akt1 signaling to endothelial nitric oxide synthase in the regulation of endothelial function and blood pressure. *Circulation research*. 2009;104(9):1085-94.
156. Deji N, Kume S, Araki S, Soumura M, Sugimoto T, Isshiki K, et al. Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet-induced obese mice. *American journal of physiology Renal physiology*. 2009;296(1):F118-26.
157. Kaneko H, Anzai T, Horiuchi K, Morimoto K, Anzai A, Nagai T, et al. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme inactivation ameliorates high-fat diet-induced insulin resistance and altered energy homeostasis. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2011;75(10):2482-90.
158. Waeckel L, Potier L, Chollet C, Taveau C, Bruneval P, Roussel R, et al. Antihypertensive role of tissue kallikrein in hyperaldosteronism in the mouse. *Endocrinology*. 2012;153(8):3886-96. Epub 2012/06/07.

159. Slim R, Torremocha F, Moreau T, Pizard A, Hunt SC, Vuagnat A, et al. Loss-of-function polymorphism of the human kallikrein gene with reduced urinary kallikrein activity. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2002;13(4):968-76. Epub 2002/03/26.
160. Azizi M, Boutouyrie P, Bissery A, Agharazii M, Verbeke F, Stern N, et al. Arterial and renal consequences of partial genetic deficiency in tissue kallikrein activity in humans. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(3):780-7.
161. Lung CC, Chan EK, Zuraw BL. Analysis of an exon 1 polymorphism of the B2 bradykinin receptor gene and its transcript in normal subjects and patients with C1 inhibitor deficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1997;99(1 Pt 1):134-46. Epub 1997/01/01.
162. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham study. *Circulation*. 1979;59(1):8-13. Epub 1979/01/01.
163. Fuller JH, Shipley MJ, Rose G, Jarrett RJ, Keen H. Coronary-heart-disease risk and impaired glucose tolerance. The Whitehall study. *Lancet*. 1980;1(8183):1373-6. Epub 1980/06/28.
164. Kleinman JC, Donahue RP, Harris MI, Finucane FF, Madans JH, Brock DB. Mortality among diabetics in a national sample. *American journal of epidemiology*. 1988;128(2):389-401. Epub 1988/08/01.
165. Rosengren A, Welin L, Tsipogianni A, Wilhelmsen L. Impact of cardiovascular risk factors on coronary heart disease and mortality among middle aged diabetic men: a general population study. *BMJ*. 1989;299(6708):1127-31. Epub 1989/11/04.
166. Haffner SM, Lehto S, Ronnemaa T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 1998;339(4):229-34. Epub 1998/07/23.
167. Wannamethee SG, Shaper AG, Whincup PH, Lennon L, Sattar N. Impact of diabetes on cardiovascular disease risk and all-cause mortality in older men: influence of age at onset, diabetes duration, and established and novel risk factors. *Archives of internal medicine*. 2011;171(5):404-10. Epub 2011/03/16.
168. Krempf M, Parhofer KG, Steg PG, Bhatt DL, Ohman EM, Rother J, et al. Cardiovascular event rates in diabetic and nondiabetic individuals with and without established atherothrombosis (from the REduction of Atherothrombosis for Continued Health

[REACH] Registry). The American journal of cardiology. 2010;105(5):667-71. Epub 2010/02/27.

169. Miettinen H, Lehto S, Salomaa V, Mahonen M, Niemela M, Haffner SM, et al. Impact of diabetes on mortality after the first myocardial infarction. The FINMONICA Myocardial Infarction Register Study Group. Diabetes care. 1998;21(1):69-75. Epub 1998/04/16.

170. Sprafka JM, Burke GL, Folsom AR, McGovern PG, Hahn LP. Trends in prevalence of diabetes mellitus in patients with myocardial infarction and effect of diabetes on survival. The Minnesota Heart Survey. Diabetes care. 1991;14(7):537-43. Epub 1991/07/01.

171. Chun BY, Dobson AJ, Heller RF. The impact of diabetes on survival among patients with first myocardial infarction. Diabetes care. 1997;20(5):704-8. Epub 1997/05/01.

172. Verges B, Zeller M, Dentan G, Beer JC, Laurent Y, Janin-Manificat L, et al. Impact of fasting glycemia on short-term prognosis after acute myocardial infarction. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2007;92(6):2136-40. Epub 2007/04/12.

173. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. BMJ. 2000;321(7258):405-12. Epub 2000/08/11.

174. Jugdutt BI. Effect of reperfusion on ventricular mass, topography, and function during healing of anterior infarction. The American journal of physiology. 1997;272(3 Pt 2):H1205-11. Epub 1997/03/01.

175. Keeley EC, Boura JA, Grines CL. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. Lancet. 2003;361(9351):13-20. Epub 2003/01/09.

176. Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, et al. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. Cardiovascular research. 2010;87(3):406-23. Epub 2010/05/08.

177. Zweier JL. Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. The Journal of biological chemistry. 1988;263(3):1353-7. Epub 1988/01/25.

178. Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. Cardiovascular research. 1998;38(2):291-300. Epub 1998/08/26.

179. Verma S, Fedak PW, Weisel RD, Butany J, Rao V, Maitland A, et al. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation*. 2002;105(20):2332-6. Epub 2002/05/22.
180. Opie LH. Proposed role of calcium in reperfusion injury. *International journal of cardiology*. 1989;23(2):159-64. Epub 1989/05/01.
181. Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition and the calcium, oxygen and pH paradoxes: one paradox after another. *Cardiovascular research*. 1999;44(3):470-3. Epub 2000/02/26.
182. Lemasters JJ, Bond JM, Chacon E, Harper IS, Kaplan SH, Ohata H, et al. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *Exs*. 1996;76:99-114. Epub 1996/01/01.
183. Kim JS, Jin Y, Lemasters JJ. Reactive oxygen species, but not Ca²⁺ overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2006;290(5):H2024-34. Epub 2006/01/10.
184. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *The New England journal of medicine*. 2007;357(11):1121-35. Epub 2007/09/15.
185. Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovascular research*. 2004;61(3):481-97. Epub 2004/02/14.
186. Litt MR, Jeremy RW, Weisman HF, Winkelstein JA, Becker LC. Neutrophil depletion limited to reperfusion reduces myocardial infarct size after 90 minutes of ischemia. Evidence for neutrophil-mediated reperfusion injury. *Circulation*. 1989;80(6):1816-27. Epub 1989/12/01.
187. Ma XL, Tsao PS, Lefer AM. Antibody to CD-18 exerts endothelial and cardiac protective effects in myocardial ischemia and reperfusion. *The Journal of clinical investigation*. 1991;88(4):1237-43. Epub 1991/10/01.
188. Baran KW, Nguyen M, McKendall GR, Lambrew CT, Dykstra G, Palmeri ST, et al. Double-blind, randomized trial of an anti-CD18 antibody in conjunction with recombinant tissue plasminogen activator for acute myocardial infarction: limitation of myocardial infarction following thrombolysis in acute myocardial infarction (LIMIT AMI) study. *Circulation*. 2001;104(23):2778-83. Epub 2001/12/06.
189. Faxon DP, Gibbons RJ, Chronos NA, Gurbel PA, Sheehan F. The effect of blockade of the CD11/CD18 integrin receptor on infarct size in patients with acute myocardial

infarction treated with direct angioplasty: the results of the HALT-MI study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;40(7):1199-204. Epub 2002/10/18.

190. Mahaffey KW, Granger CB, Nicolau JC, Ruzyllo W, Weaver WD, Theroux P, et al. Effect of pexelizumab, an anti-C5 complement antibody, as adjunctive therapy to fibrinolysis in acute myocardial infarction: the COMPLEMENT inhibition in myocardial infarction treated with thromboLYtics (COMPLY) trial. *Circulation*. 2003;108(10):1176-83. Epub 2003/08/20.

191. Armstrong PW, Granger CB, Adams PX, Hamm C, Holmes D, Jr., O'Neill WW, et al. Pexelizumab for acute ST-elevation myocardial infarction in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2007;297(1):43-51. Epub 2007/01/04.

192. Ross AM, Gibbons RJ, Stone GW, Kloner RA, Alexander RW. A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II). *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;45(11):1775-80. Epub 2005/06/07.

193. Kloner RA, Forman MB, Gibbons RJ, Ross AM, Alexander RW, Stone GW. Impact of time to therapy and reperfusion modality on the efficacy of adenosine in acute myocardial infarction: the AMISTAD-2 trial. *European heart journal*. 2006;27(20):2400-5. Epub 2006/06/20.

194. Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *The Biochemical journal*. 1995;307 (Pt 1):93-8. Epub 1995/04/01.

195. Gateau-Roesch O, Argaud L, Ovize M. Mitochondrial permeability transition pore and postconditioning. *Cardiovascular research*. 2006;70(2):264-73. Epub 2006/04/04.

196. Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*. 1982;66(6):1146-9. Epub 1982/12/01.

197. Wei GZ, Zhou JJ, Wang B, Wu F, Bi H, Wang YM, et al. Diastolic Ca²⁺ overload caused by Na⁺/Ca²⁺ exchanger during the first minutes of reperfusion results in continued myocardial stunning. *European journal of pharmacology*. 2007;572(1):1-11. Epub 2007/09/08.

198. Krug A, Du Mesnil de R, Korb G. Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion. *Circulation research*. 1966;19(1):57-62. Epub 1966/07/01.

199. Ito H. No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction. *Nature clinical practice Cardiovascular medicine*. 2006;3(9):499-506. Epub 2006/08/26.

200. de Lorgeril M, Basmadjian A, Clement R, Rousseau G, Latour JG. Influence of reflow ventricular fibrillation and electrical defibrillation on infarct size in a canine preparation of myocardial infarction. *Cardiovascular research*. 1990;24(2):151-5. Epub 1990/02/01.
201. Manning AS, Hearse DJ. Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1984;16(6):497-518. Epub 1984/06/01.
202. Kloner RA. Does reperfusion injury exist in humans? *Journal of the American College of Cardiology*. 1993;21(2):537-45. Epub 1993/02/01.
203. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124-36. Epub 1986/11/01.
204. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2003;285(2):H579-88. Epub 2003/07/16.
205. Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiological reviews*. 2008;88(2):581-609. Epub 2008/04/09.
206. Abdallah Y, Gkatzoflia A, Gligorievski D, Kasseckert S, Euler G, Schluter KD, et al. Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca²⁺ storage. *Cardiovascular research*. 2006;70(2):346-53. Epub 2006/03/30.
207. Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, et al. Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(11):1535-49. Epub 2004/06/03.
208. Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 2008;359(5):473-81. Epub 2008/08/02.
209. Mewton N, Croisille P, Gahide G, Rioufol G, Bonnefoy E, Sanchez I, et al. Effect of cyclosporine on left ventricular remodeling after reperfused myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;55(12):1200-5. Epub 2010/03/20.
210. Tani M, Neely JR. Hearts from diabetic rats are more resistant to in vitro ischemia: possible role of altered Ca²⁺ metabolism. *Circulation research*. 1988;62(5):931-40. Epub 1988/05/01.

211. Liu Y, Thornton JD, Cohen MV, Downey JM, Schaffer SW. Streptozotocin-induced non-insulin-dependent diabetes protects the heart from infarction. *Circulation*. 1993;88(3):1273-8. Epub 1993/09/01.
212. Tosaki A, Engelman DT, Engelman RM, Das DK. The evolution of diabetic response to ischemia/reperfusion and preconditioning in isolated working rat hearts. *Cardiovascular research*. 1996;31(4):526-36. Epub 1996/04/01.
213. Forrat R, Sebbag L, Wiernsperger N, Guidollet J, Renaud S, de Lorgeril M. Acute myocardial infarction in dogs with experimental diabetes. *Cardiovascular research*. 1993;27(11):1908-12. Epub 1993/11/01.
214. Gross ER, Hsu AK, Gross GJ. Diabetes abolishes morphine-induced cardioprotection via multiple pathways upstream of glycogen synthase kinase-3beta. *Diabetes*. 2007;56(1):127-36. Epub 2006/12/29.
215. Balakumar P, Sharma NK. Healing the diabetic heart: does myocardial preconditioning work? *Cellular signalling*. 2012;24(1):53-9. Epub 2011/09/29.
216. Miki T, Itoh T, Sunaga D, Miura T. Effects of diabetes on myocardial infarct size and cardioprotection by preconditioning and postconditioning. *Cardiovascular diabetology*. 2012;11:67. Epub 2012/06/15.
217. Xu G, Takashi E, Kudo M, Ishiwata T, Naito Z. Contradictory effects of short- and long-term hyperglycemias on ischemic injury of myocardium via intracellular signaling pathway. *Experimental and molecular pathology*. 2004;76(1):57-65. Epub 2004/01/24.
218. Marfella R, Di Filippo C, Esposito K, Nappo F, Piegari E, Cuzzocrea S, et al. Absence of inducible nitric oxide synthase reduces myocardial damage during ischemia reperfusion in streptozotocin-induced hyperglycemic mice. *Diabetes*. 2004;53(2):454-62. Epub 2004/01/30.
219. Di Filippo C, Marfella R, Cuzzocrea S, Piegari E, Petronella P, Giugliano D, et al. Hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rat increases infarct size associated with low levels of myocardial HO-1 during ischemia/reperfusion. *Diabetes*. 2005;54(3):803-10. Epub 2005/03/01.
220. Marso SP, Miller T, Rutherford BD, Gibbons RJ, Qureshi M, Kalynych A, et al. Comparison of myocardial reperfusion in patients undergoing percutaneous coronary intervention in ST-segment elevation acute myocardial infarction with versus without diabetes mellitus (from the EMERALD Trial). *The American journal of cardiology*. 2007;100(2):206-10. Epub 2007/07/17.

221. Alegria JR, Miller TD, Gibbons RJ, Yi QL, Yusuf S. Infarct size, ejection fraction, and mortality in diabetic patients with acute myocardial infarction treated with thrombolytic therapy. *American heart journal*. 2007;154(4):743-50. Epub 2007/09/26.
222. Donahoe SM, Stewart GC, McCabe CH, Mohanavelu S, Murphy SA, Cannon CP, et al. Diabetes and mortality following acute coronary syndromes. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2007;298(7):765-75. Epub 2007/08/21.
223. Bouhidel O, Pons S, Souktani R, Zini R, Berdeaux A, Ghaleh B. Myocardial ischemic postconditioning against ischemia-reperfusion is impaired in ob/ob mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2008;295(4):H1580-6. Epub 2008/08/12.
224. Ichinomiya T, Cho S, Higashijima U, Matsumoto S, Maekawa T, Sumikawa K. High-dose fasudil preserves postconditioning against myocardial infarction under hyperglycemia in rats: role of mitochondrial KATP channels. *Cardiovascular diabetology*. 2012;11:28. Epub 2012/03/23.
225. Drenger B, Ostrovsky IA, Barak M, Nechemia-Arbely Y, Ziv E, Axelrod JH. Diabetes blockade of sevoflurane postconditioning is not restored by insulin in the rat heart: phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3- and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated inhibition. *Anesthesiology*. 2011;114(6):1364-72. Epub 2011/03/04.
226. Hotta H, Miura T, Miki T, Togashi N, Maeda T, Kim SJ, et al. Angiotensin II type 1 receptor-mediated upregulation of calcineurin activity underlies impairment of cardioprotective signaling in diabetic hearts. *Circulation research*. 2010;106(1):129-32. Epub 2009/11/17.
227. Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Carr RD, Yellon DM. Preconditioning the diabetic heart: the importance of Akt phosphorylation. *Diabetes*. 2005;54(8):2360-4. Epub 2005/07/28.
228. Ghaboura N, Tamarelle S, Ducluzeau PH, Grimaud L, Loufrani L, Croue A, et al. Diabetes mellitus abrogates erythropoietin-induced cardioprotection against ischemic-reperfusion injury by alteration of the RISK/GSK-3beta signaling. *Basic research in cardiology*. 2011;106(1):147-62. Epub 2010/10/29.
229. Miki T, Miura T, Hotta H, Tanno M, Yano T, Sato T, et al. Endoplasmic reticulum stress in diabetic hearts abolishes erythropoietin-induced myocardial protection by impairment of phospho-glycogen synthase kinase-3beta-mediated suppression of mitochondrial permeability transition. *Diabetes*. 2009;58(12):2863-72. Epub 2009/09/17.

230. Przyklenk K, Maynard M, Greiner DL, Whittaker P. Cardioprotection with postconditioning: loss of efficacy in murine models of type-2 and type-1 diabetes. *Antioxidants & redox signaling*. 2011;14(5):781-90. Epub 2010/06/29.
231. Pan HL, Chen SR, Scicli GM, Carretero OA. Cardiac interstitial bradykinin release during ischemia is enhanced by ischemic preconditioning. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2000;279(1):H116-21. Epub 2000/07/19.
232. Park SS, Zhao H, Mueller RA, Xu Z. Bradykinin prevents reperfusion injury by targeting mitochondrial permeability transition pore through glycogen synthase kinase 3beta. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2006;40(5):708-16. Epub 2006/03/07.
233. Bell RM, Yellon DM. Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2003;35(2):185-93. Epub 2003/02/28.
234. Griol-Charhbili V, Messadi-Laribi E, Bascands JL, Heudes D, Meneton P, Giudicelli JF, et al. Role of tissue kallikrein in the cardioprotective effects of ischemic and pharmacological preconditioning in myocardial ischemia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19(9):1172-4.
235. Hartman JC, Wall TM, Hullinger TG, Shebuski RJ. Reduction of myocardial infarct size in rabbits by ramiprilat: reversal by the bradykinin antagonist HOE 140. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1993;21(6):996-1003. Epub 1993/06/01.
236. Liu YH, Yang XP, Sharov VG, Sigmon DH, Sabbath HN, Carretero OA. Paracrine systems in the cardioprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Hypertension*. 1996;27(1):7-13. Epub 1996/01/01.
237. Xi L, Das A, Zhao ZQ, Merino VF, Bader M, Kukreja RC. Loss of myocardial ischemic postconditioning in adenosine A1 and bradykinin B2 receptors gene knockout mice. *Circulation*. 2008;118(14 Suppl):S32-7. Epub 2008/10/10.
238. Chahine R, Adam A, Yamaguchi N, Gaspo R, Regoli D, Nadeau R. Protective effects of bradykinin on the ischaemic heart: implication of the B1 receptor. *British journal of pharmacology*. 1993;108(2):318-22. Epub 1993/02/01.
239. Lagneux C, Bader M, Pesquero JB, Demenge P, Ribuot C. Detrimental implication of B1 receptors in myocardial ischemia: evidence from pharmacological blockade and gene knockout mice. *International immunopharmacology*. 2002;2(6):815-22. Epub 2002/07/04.

240. Yin H, Chao J, Bader M, Chao L. Differential role of kinin B1 and B2 receptors in ischemia-induced apoptosis and ventricular remodeling. *Peptides*. 2007;28(7):1383-9. Epub 2007/07/24.
241. Cote J, Savard M, Bovenzi V, Belanger S, Morin J, Neugebauer W, et al. Novel kinin B1 receptor agonists with improved pharmacological profiles. *Peptides*. 2009;30(4):788-95. Epub 2009/01/20.
242. Belanger S, Bovenzi V, Cote J, Neugebauer W, Amblard M, Martinez J, et al. Structure-activity relationships of novel peptide agonists of the human bradykinin B2 receptor. *Peptides*. 2009;30(4):777-87. Epub 2008/12/30.
243. Darling CE, Jiang R, Maynard M, Whittaker P, Vinten-Johansen J, Przyklenk K. Postconditioning via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts: role of ERK1/2. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2005;289(4):H1618-26. Epub 2005/06/07.
244. Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. Cross-talk between the survival kinases during early reperfusion: its contribution to ischemic preconditioning. *Cardiovascular research*. 2004;63(2):305-12. Epub 2004/07/14.
245. Yang XM, Krieg T, Cui L, Downey JM, Cohen MV. NECA and bradykinin at reperfusion reduce infarction in rabbit hearts by signaling through PI3K, ERK, and NO. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2004;36(3):411-21. Epub 2004/03/11.
246. Xu J, Carretero OA, Sun Y, Shesely EG, Rhaleb NE, Liu YH, et al. Role of the B1 kinin receptor in the regulation of cardiac function and remodeling after myocardial infarction. *Hypertension*. 2005;45(4):747-53. Epub 2005/02/09.
247. Xu J, Carretero OA, Shesely EG, Rhaleb NE, Yang JJ, Bader M, et al. The kinin B1 receptor contributes to the cardioprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers in mice. *Experimental physiology*. 2009;94(3):322-9. Epub 2008/12/09.
248. Kakoki M, McGarrah RW, Kim HS, Smithies O. Bradykinin B1 and B2 receptors both have protective roles in renal ischemia/reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(18):7576-81. Epub 2007/04/25.
249. Wang PH, Campanholle G, Cenedeze MA, Feitoza CQ, Goncalves GM, Landgraf RG, et al. Bradykinin [corrected] B1 receptor antagonism is beneficial in renal ischemia-reperfusion injury. *PloS one*. 2008;3(8):e3050.

250. Yin X, Zheng Y, Zhai X, Zhao X, Cai L. Diabetic inhibition of preconditioning- and postconditioning-mediated myocardial protection against ischemia/reperfusion injury. *Experimental diabetes research*. 2012;2012:198048. Epub 2011/08/09.
251. Heusch G. Heart rate in the pathophysiology of coronary blood flow and myocardial ischaemia: benefit from selective bradycardic agents. *British journal of pharmacology*. 2008;153(8):1589-601. Epub 2008/01/29.
252. Campos MM, Calixto JB. Involvement of B1 and B2 receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. *British journal of pharmacology*. 1995;114(5):1005-13. Epub 1995/03/01.
253. Michael LH, Ballantyne CM, Zachariah JP, Gould KE, Pocius JS, Taffet GE, et al. Myocardial infarction and remodeling in mice: effect of reperfusion. *The American journal of physiology*. 1999;277(2 Pt 2):H660-8. Epub 1999/08/13.

ANNEXES

1. EVOLUTION DES CARACTERISTIQUES DES PATIENTS DE LA COHORTE DESIR SELON LEUR GENOTYPE RR, RH ET HH SUR LES 9 ANS DE SUIVI.

	baseline			3 years			6 years			9 years			p genotype	p time	p interaction
	RR	RH	HH	RR	RH	HH	RR	RH	HH	RR	RH	HH			
BMI (kg/m ²)	24.6±3.6	24.4±3.5	24.7±4.7	25.0±3.8	25.0±3.6	24.1±3.4	25.4±4.0	25.5±3.7	23.9±3.7	25.7±4.1	25.6±4.0	23.9±3.6	0.82	0.09	0.02
FPG (mmol/l)	5.3±0.6	5.3±0.6	5.7±0.7	5.3±0.6	5.3±0.7	5.1±0.5	5.4±0.8	5.3±0.7	5.5±0.4	5.5±0.9	5.4±0.6	5.3±0.4	0.53	0.15	0.10
HOMA-IR	1.0±0.6	1.0±0.5	1.7±2.4	1.1±0.7	1.1±0.6	1.4±1.3	1.2±0.8	1.1±0.7	1.6±1.4	1.4±1.0	1.3±0.8	1.2±1.0	0.26	0.78	0.20
Insulinemia (pmol/l)	45.3±26.5	43.6±22.5	80.3±50.2	51.2±33.7	48.6±25.9	64.7±29.0	53.0±35.2	51.1±32.2	72.1±29.7	62.2±47.4	59.0±38.5	54.9±19.3	0.28	0.84	0.22
SBP (mmHg)	130.8±15.2	130.7±14.6	137.0±14.1	129.9±16.1	129.1±15.3	130.2±5.9	134.3±19.4	135.0±19.6	136.2±7.5	135.6±19.2	135.0±18.8	136.0±6.2	0.93	0.04	0.83
HR (bpm)	66.9±9.8	67.7±10.4	70.2±9.8	67.4±10.3	66.8±11.0	67.4±12.8	68.3±10.8	68.9±11.4	66.0±10.3	67.9±10.5	67.9±10.8	67.4±9.7	0.98	0.93	0.33

Tableau : Evolution des caractéristiques des sujets durant les 9 ans de suivi en fonction de leur génotype RR, RH et HH.

2. PROTOCOLE D'ISCHEMIE-REPERFUSION CARDIAQUE

Ligature réversible de l'artère coronaire

Les souris sont anesthésiées au pentobarbital sodique (60 mg/kg, *ip*). Après intubation endotrachéale, les souris sont positionnées sur le dos sur une couverture chauffante maintenue à $37 \pm 1^\circ\text{C}$, les pattes en extension avec la patte arrière gauche par-dessus la patte arrière droite pour une position idéale du cœur. Les souris sont ventilées avec de l'oxygène pur (volume courant : 200 μl , fréquence respiratoire : 170 cycles/min) avec un respirateur Harvard de type 845 (Harvard Apparatus, Les Ulis, France). A ce stade, la chirurgie est réalisée sous une loupe binoculaire Leica de type MZ75 (Leica Microsystems, Rueil Malmaison, France) : un cathéter PE 10 est introduit dans la veine jugulaire et servira par la suite à injecter soit le véhicule, soit les divers agents pharmacologiques étudiés. Par la suite, les muscles thoraciques sont délicatement séparés et retenus par du Prolène 6/0 (EthnorEthicon, Issy les Moulineaux, France) et une thoracotomie latérale gauche est effectuée au niveau du troisième espace intercostal. Après incision du péricarde, la branche majeure de l'artère coronaire gauche est identifiée, les deux principales difficultés étant de visualiser l'artère coronaire et de placer la ligature. Chez la souris, il y a, de manière générale, deux artères coronaires majeures : une gauche et une droite qui prennent naissance au niveau de l'aorte. L'artère coronaire droite se divise en deux branches : une branche qui irrigue le ventricule droit (VD) et une branche qui irrigue la région septale. L'artère coronaire gauche est visible, dans la plupart des cas, de la base jusqu'à un tiers de son trajet, s'enfonçant ensuite dans le myocarde. Un fil Prolène 8/0 (EthnorEthicon, Issy les Moulineaux, France) est placé sous l'artère coronaire gauche au niveau de la bifurcation principale, c'est-à-dire à 2 mm de l'extrémité de l'oreillette gauche (Figure 16).

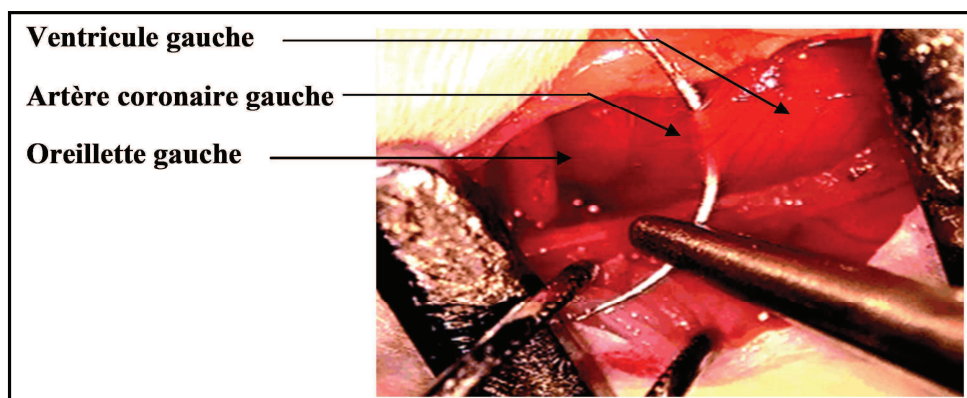


Figure 15 : Localisation de la ligature coronaire chez la souris.

Selon la technique de Michael et coll. (253), les deux extrémités du fil Prolène sont insérées dans un «snare» (petit bout de cathéter PE10 de 3 mm de long) formant ainsi un système de lasso. Grâce à un clamp, ce lasso peut être serré pour réaliser l'occlusion puis relâché pour permettre la reperfusion (Figure 17). L'occlusion est contrôlée par le changement de coloration du ventricule gauche (VG) et par la surélévation du segment ST sur le tracé électrocardiographique (ECG, Biotach, Gould et Nicolet, les Ulis, France) (Figure 18). La reperfusion est réalisée par relâchement du clamp, et est objectivée par la recoloration du VG et la normalisation du tracé ECG.

Pour que la reperfusion se déroule dans les meilleures conditions, la cage thoracique est refermée à l'aide de Prolène 6/0 (EthnorEthicon, Issy les Moulineaux, France).

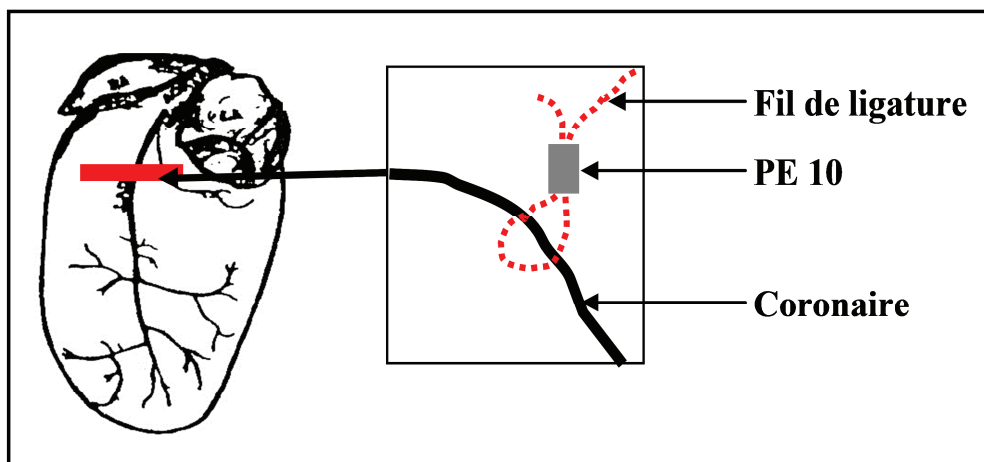


Figure 16 : Ligature coronaire réversible.

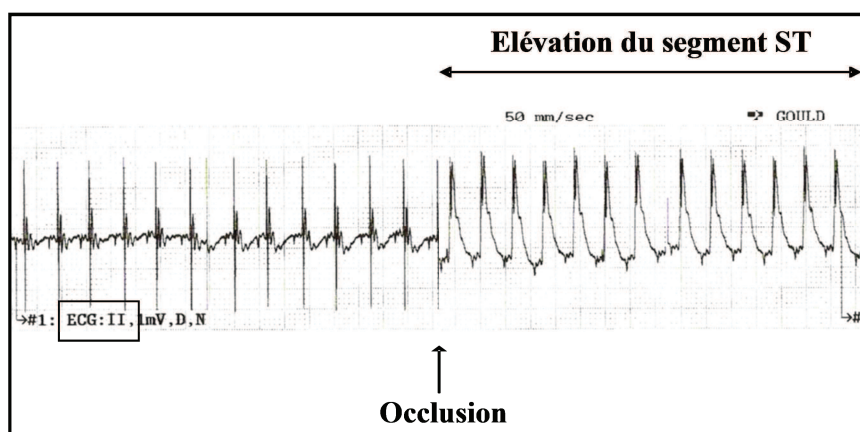


Figure 17 : Tracé électrocardiographique avant et au cours de l'ischémie coronaire.

Au bout des trois heures de reperfusion, on réalise successivement une réouverture du thorax, une occlusion définitive de l'artère coronaire et une injection par la veine jugulaire de 0.5 ml d'une solution de bleu Evans (5%, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). Le passage de ce colorant dans la circulation générale de l'animal se traduit dans un premier temps par la coloration en bleu des poumons, des muqueuses et de la peau de l'animal. Au niveau du cœur, la zone irriguée par la coronaire reste blanche et constitue l'aire à risque (AAR), le reste du cœur étant coloré en bleu. Le cœur est prélevé, les oreillettes et le VD sont séparés. Le VG est pesé puis découpé en quatre tranches qui sont pesées : la base (correspondant à la tranche située au-dessus de la ligature), deux coupes médianes (coupes 2 et 3), et l'apex (Figure 19).

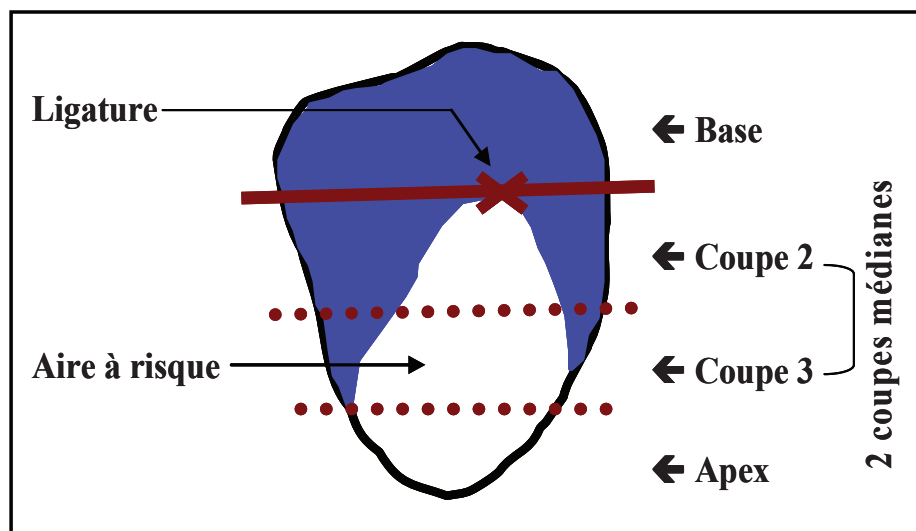


Figure 18 : Représentation schématique des coupes du cœur en vue de l'analyse d'image.

Après plusieurs expériences préalables, et en accord avec les données de la littérature, nous avons opté pour un temps d'ischémie de 30 minutes avec une durée de reperfusion de 180 minutes.

Quantification de la taille de l'infarctus

Les coupes du VG sont photographiées une première fois, après coloration au bleu Evans (Figure 20), à l'aide d'un appareil photo numérique (Zoom Digital Camera 120, Kodak, New-york, Etats-Unis.), ce qui permet de déterminer l'AAR par analyse d'image. Elles sont ensuite placées dans une solution de TTC (1%) (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, AcrosOrganics, Fischer ScientificLabosi, Elancourt, France) pendant 20 minutes, puis dans une solution de

formol (10%) pendant 24 heures. Le TTC colore en rouge les tissus vivants car il est réduit par les déshydrogénases abondantes dans les tissus vivants ; en revanche, dans les zones nécrosées, le TTC ne peut être réduit et celles-ci restent blanches. Les coupes sont alors photographiées une seconde fois, en vue de la détermination de la zone infarctée blanche (INF) (Figure 20).

Les surfaces des AAR et des INF sont déterminées par analyse d'image (Scion 4.02, Scion Corporation, Maryland, Etats-Unis) à partir de la face supérieure des coupes 2, 3 et de l'apex. Les valeurs de ces surfaces sont ensuite pondérées en fonction des poids respectifs des coupes.

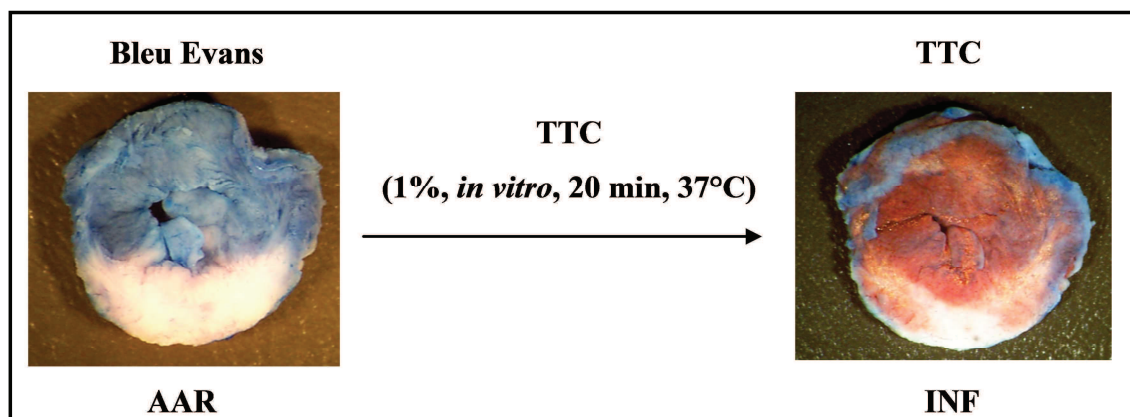


Figure 19 : Coupe de ventricule gauche. Après injection de bleu Evans et prélèvement du cœur, la coupe est photographiée une première fois pour permettre la détermination de la taille de l'aire à risque (AAR) puis est mise à incuber avec du TTC à 37°C et photographiée une deuxième fois afin d'obtenir l'évaluation de l'infarctus (INF) après reperfusion.

Pour chaque cœur, on détermine les trois rapports suivants : AAR/VG, INF/VG et INF/AAR, qui sont exprimés en pourcentage et calculés comme suit :

$$\text{AAR/VG} = \sum \text{des poids des AAR} \times 100 / \text{Poids du VG}$$

$$\text{INF/VG} = \sum \text{des poids des INF} \times 100 / \text{Poids du VG}$$

$$\text{INF/AAR} = \sum \text{des poids des INF} \times 100 / \sum \text{des poids des AAR}$$

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Principales voies de synthèse et de dégradation des kinines.....	13
Figure 2 : Séquence en acides aminés des principaux peptides naturels de la famille des kinines chez l'homme.....	14
Figure 3 : séquence peptidique des récepteurs B1 et B2.....	17
Figure 4 : Schéma de l'organisation moléculaire du SKK.....	20
Figure 5 : Causes de mortalité dans le monde en 2000 et 2011 (Données OMS, Department of HealthStatistics and Information Systems, 2013).....	97
Figure 6 : Schématisation du concept de lésions d'ischémie reperfusion. Au cours de l'ischémie, en l'absence de reperfusion, les lésions ischémiques vont progressivement conduire à la mort cellulaire et évoluer jusqu'à la nécrose de l'ensemble du tissu ischémié (ligne pointillé rouge). La reperfusion interrompt le processus de mort cellulaire ischémique mais entraine des lésions cellulaires qui se surajoute à celles dues à la période ischémique: les lésions de reperfusion. Le résultat net, cependant, est que le tissu reperfusé subit moins de mort cellulaire qu'en l'absence de reperfusion. (D'après (176)).....	100
Figure 7 : Protocoles de cardioprotection par préconditionnement (PC) ou postconditionnement (PostC). La taille de l'infarctus mesurée in vivo chez l'animal, après une occlusion coronaire (IR simple) peut être considérablement réduite par une ou plusieurs séquences brèves d'ischémie-reperfusion appliquées soit avant l'ischémie longue (Préconditionnement ischémique, PC ischémique), soit au moment de la reperfusion (Postconditionnement ischémique, PostC ischémique). Le bénéfice de cette intervention peut aussi être reproduit par une intervention thérapeutique qui précède ou fait suite à l'occlusion coronaire : on parle de Préconditionnement pharmacologique (PC pharmacologique) ou de Postconditionnement pharmacologique (PostC pharmacologique) respectivement.....	105
Figure 8 : Voies de signalisation intracellulaire impliquées dans le PostC. Le PostC active, via différents médiateurs, la voie RISK (ERK1/2, PI3K/Akt) qui conduit à l'inhibition de GSK-3 β empêchant ainsi l'ouverture du mitoPTP (PTP) et diminuant la mort cellulaire. Le PostC va également diminuer la correction trop brutale de l'acidose secondaire à l'ischémie et diminuer la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).....	107

Figure 9 : Structure en 2 dimensions de l'agoniste peptidique du B1R.....	113
Figure 10 : Structure en 2 dimensions de l'agoniste peptidique du B2R.....	114
Figure 11 : effet sur la pression artérielle moyenne (PAM) (A) et la fréquence cardiaque (FC) (B) de l'injection IV de l'agoniste B2R. * $p < 0.05$ vs. Sérum physiologique (Sérum phy.), † $p < 0.05$ vs. dose de 10 nmol/kg.....	117
Figure 12 : effet de l'agoniste B2R sur la pression artérielle moyenne (PAM) (A) et sur la fréquence cardiaque (FC) (B) chez les souris non diabétiques (barres blanches) et diabétiques (barres noires).....	118
Figure 13 : effet sur la pression artérielle moyenne (PAM) et la fréquence cardiaque (FC) de l'injection IV de l'agoniste B2R (barres blanches) et de la bradykinine (BK) (barres grises). * $p < 0.05$ vs. BK à la même dose.....	119
Figure 14 : durée d'action de l'effet tensionnel de l'agoniste B2R (barre blanche) et de la bradykinine (BK, barre hachurée). La durée d'action est définie comme le temps entre l'injection de l'agoniste et le retour à la valeur basale de la pression artérielle. Elle a été mesurée pour la dose de 1 nmol/kg. * $p < 0.05$ vs. Bradykinine.....	120
Figure 15 : Localisation de la ligature coronaire chez la souris.....	162
Figure 16 : Ligature coronaire réversible.....	163
Figure 17 : Tracé électrocardiographique avant et au cours de l'ischémie coronaire.....	163
Figure 18 : Représentation schématique des coupes du cœur en vue de l'analyse d'image.....	164
Figure 19 : Coupe de ventricule gauche. Après injection de bleu Evans et prélèvement du cœur, la coupe est photographiée une première fois pour permettre la détermination de la taille de l'aire à risque (AAR) puis est mise à incuber avec du TTC à 37°C et photographiée une deuxième fois afin d'obtenir l'évaluation de l'infarctus (INF) après reperfusion.....	165

RESUME

Le système kallicréine-kinines (SKK) est un système peptidique vasodilatateur, négativement couplé au système rénine angiotensine par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). Les métabolites actifs du système, les kinines, sont produites par action de la kallicréine tissulaire (TK), et agissent via leurs deux récepteurs, le récepteur B2 (B2R) le plus exprimé et le récepteur B1 (B1R). Les effets bénéfiques des inhibiteurs de l'ECA sont liés en partie à l'activation du SKK. Le SKK a été impliqué dans les processus physiopathologiques conduisant au diabète de type 2. Son rôle est bien établi dans la protection contre le développement des complications cardiovasculaires et rénales du diabète de type 1. C'est également un système de cardioprotection lors de l'ischémie reperfusion cardiaque (IR).

Nous avons étudié dans la première partie de ce travail le rôle controversé du SKK dans le développement des anomalies métaboliques liées à l'obésité en utilisant des souris déficientes en TK dans deux modèles d'obésité, génétique (mutation ob/ob) et acquise, par régime gras. Nous n'avons pas mis en évidence d'effet de la déficience en TK sur les anomalies glucidiques dans ces deux modèles. Ces résultats obtenus chez la souris ont été étendus par l'étude chez l'homme de l'effet d'un polymorphisme génétique de la TK entraînant une perte d'activité enzymatique sur l'évolution des paramètres métaboliques dans une cohorte de 4843 sujets de la population générale suivi pendant 9 ans. Nous n'avons pas observé d'effet d'un déficit partiel en activité TK sur l'apparition des troubles métaboliques suggestifs de résistance à l'insuline, et du diabète de type 2.

La deuxième partie du travail a concerné les complications cardiovasculaires du diabète. Elle représente une évaluation expérimentale d'une nouvelle stratégie thérapeutique pour la prévention des conséquences myocardiques de l'ischémie-reperfusion cardiaque, en dehors et au cours du diabète. Des agonistes pharmacologiques prototypiques des récepteurs des kinines, sélectifs du récepteur B1 ou B2, ont été administrés lors de la reperfusion, chez des souris non diabétique et diabétiques. Chez les souris non diabétiques, l'agoniste B2, comme le ramiprilat (un inhibiteur de l'ECA) et le postconditionnement ischémique, réduit la taille de l'infarctus via l'activation de la voie PI3K/Akt et l'inhibition de GSK3- β . L'agoniste B1 n'a pas d'effet. Chez les souris diabétiques, l'agoniste B2, le ramiprilat et le postconditionnement ischémique, n'ont pas d'effet. En revanche, l'agoniste B1 diminue la taille de l'infarctus via l'activation des voies PI3K/Akt et ERK1/2, conduisant à l'inhibition de GSK3- β . L'effet différentiel des agonistes B1 et B2 chez les souris diabétiques et non diabétique est lié à l'inactivation du B2R et à l'induction de la synthèse du B1R dans le cœur diabétique. L'agoniste B1 permet de surmonter la résistance du cœur diabétique aux traitements cardioprotecteurs.

Nos travaux clarifient le rôle du SKK dans le développement du diabète et de ses complications cardiaques. La mise en évidence de l'effet cardioprotecteur d'agonistes pharmacologiques des récepteurs des kinines dans le cœur ischémique diabétique et non diabétique ouvre une nouvelle piste thérapeutique dans la prise en charge des patients présentant un syndrome coronarien aigu.